

IN VIVO UNTERSUCHUNGEN
ZUR WIRKUNG VON INFLUEX^R
BZW. ALKOHOL
AUF DAS ABWEHRSYSTEM
VERSCHIEDENER HÜHNERLINIEN
NACH ORALER VERABREICHUNG

Norbert Klumpp



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554610_0045

Aus dem Institut für
Physiologie, Physiologische Chemie und Ernährungsphysiologie
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Geschäftsführender Vorstand: Prof. Dr. H. Zucker

Angefertigt unter Leitung von
Prof. Dr. U. Lösch

IN VIVO UNTERSUCHUNGEN ZUR WIRKUNG VON INFLUEX^R
BZW . ALKOHOL AUF DAS ABWEHRSYSTEM
VERSCHIEDENER HÜHNERLINIEN
NACH ORALER VERABREICHUNG

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
NORBERT KLUMPP
aus
Freudenstadt

München 1986

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. H. Zucker

Referent: Prof. Dr. U. Lösch

Korreferent: Prof. Dr. M.-A. Hasslinger

Tag der Promotion: 28. Februar 1986

MEINEN ELTERN

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG
2. MATERIAL UND METHODEN
 - 2.1. Tiermaterial
 - 2.2. Antigen
 - 2.3. Prüfsubstanzen
 - 2.4. Immunisierung
 - 2.5. Verabreichung der Prüfsubstanzen
 - 2.6. Serumgewinnung
 - 2.7. Antiseren
 - 2.8. Rocket-Immunelektrophorese
 - 2.9. Affinitätschromatographie an Sepharose 4B
 - 2.10. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)
 - 2.11. Carbon-Clearance-Test
 - 2.12. Versuchsablauf
 - 2.13. Statistische Methoden
3. ERGEBNISSE
 - 3.1. Serumimmunglobulin- und Anti-HSA Antikörperkonzentrationen
 - 3.1.1. Kontrolltiere (HNL)
 - 3.1.1.1. Serum-IgG-Konzentration nach Injektion von HSA und oraler Verabreichung von Wasser bzw. Alkohol
 - 3.1.1.2. Serum-IgM-Konzentration nach Injektion von HSA und oraler Verabreichung von Wasser bzw. Alkohol
 - 3.1.1.3. Serum-IgA-Konzentration nach Injektion von HSA und oraler Verabreichung von Wasser bzw. Alkohol
 - 3.1.1.4. Anti-HSA IgG-Konzentration nach Injektion von HSA und oraler Verabreichung von Wasser bzw. Alkohol

- 3.1.1.5. Anti-HSA IgM-Konzentration nach Injektion von HSA und oraler Verabreichung von Wasser bzw. Alkohol
- 3.1.1.6. Anti-HSA IgA-Konzentration nach Injektion von HSA und oraler Verabreichung von Wasser bzw. Alkohol
- 3.1.2. Dysgammaglobulinämische Tiere
 - 3.1.2.1. Serum-IgG-Konzentration nach Injektion von HSA und oraler Verabreichung von Wasser, Alkohol, INFLUEX in alkoholischer Lösung und INFLUEX in wässriger Lösung
 - 3.1.2.2. Serum-IgM-Konzentration nach Injektion von HSA und oraler Verabreichung von Wasser, Alkohol, INFLUEX in alkoholischer Lösung und INFLUEX in wässriger Lösung
 - 3.1.2.3. Serum-IgA-Konzentration nach Injektion von HSA und oraler Verabreichung von Wasser, Alkohol, INFLUEX in alkoholischer Lösung und INFLUEX in wässriger Lösung
 - 3.1.2.4. Anti-HSA IgG-Konzentration nach Injektion von HSA und oraler Verabreichung von Wasser, Alkohol, INFLUEX in alkoholischer Lösung und INFLUEX in wässriger Lösung
 - 3.1.2.5. Anti-HSA IgM-Konzentration nach Injektion von HSA und oraler Verabreichung von Wasser, Alkohol, INFLUEX in alkoholischer Lösung und INFLUEX in wässriger Lösung
 - 3.1.2.6. Anti-HSA IgA-Konzentration nach Injektion von HSA und oraler Verabreichung von Wasser, Alkohol, INFLUEX in alkoholischer Lösung und INFLUEX in wässriger Lösung
- 3.1.3. Keimfreie Tiere
 - 3.1.3.1. Serum-IgG-Konzentration nach Injektion von HSA und oraler Verabreichung von Wasser bzw. Alkohol

- 3.1.3.2. Serum-IgM-Konzentration nach Injektion von HSA und oraler Verabreichung von Wasser bzw. Alkohol
- 3.1.3.3. Serum-IgA-Konzentration nach Injektion von HSA und oraler Verabreichung von Wasser bzw. Alkohol
- 3.1.3.4. Anti-HSA IgG-Konzentration nach Injektion von HSA und oraler Verabreichung von Wasser bzw. Alkohol
- 3.1.3.5. Anti-HSA IgM-Konzentration nach Injektion von HSA und oraler Verabreichung von Wasser bzw. Alkohol
- 3.1.3.6. Anti-HSA IgA-Konzentration nach Injektion von HSA und oraler Verabreichung von Wasser bzw. Alkohol
- 3.2. Carbon-Clearance-Test
 - 3.2.1. Phagozytoseindices von Kontrollhühnern nach oraler Behandlung mit Wasser, Alkohol, INFLUEX in alkoholischer Lösung und INFLUEX in wässriger Lösung
 - 3.2.2. Phagozytoseindices von dysgammaglobulinämischen Hühnern nach oraler Behandlung mit Wasser, Alkohol und INFLUEX in wässriger Lösung
 - 3.2.3. Phagozytoseindices von agammaglobulinämischen Hühnern nach Behandlung mit Wasser bzw. Alkohol
 - 3.2.4. Phagozytoseindices der mit Wasser behandelten Kontrolltiere, dysgammaglobulinämischen Tiere und agammaglobulinämischen Tiere im Vergleich
- 4. DISKUSSION
 - 4.1. Besprechung der Methoden
 - 4.2. Besprechung der Ergebnisse
- 5. ZUSAMMENFASSUNG
- 6. SUMMARY
- 7. TABELLARISCHER ANHANG
- 8. LITERATURVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG

Als Testmodell für die Wirkung von Alkohol und von biologischen Arzneimittelpräparaten auf das körpereigene Abwehrsystem bieten sich auf der einen Seite in vitro Systeme (z. B. zur Bestimmung der Phagozytoseleistung bestimmter Zellpopulationen, zur Bestimmung der Lymphozytenproliferation oder der zytolytischen Aktivität von Natural-Killerzellen) und auf der anderen Seite tierische bzw. menschliche Probanden als in vivo Systeme an, wobei letztere den Vorteil bieten, einen Einblick in das mit den übrigen Organsystemen in Verbindung stehenden Abwehrsystem zu gestatten. Als interessantes tierisches Modell ist das Haushuhn anzusehen, da neben den immunologisch intakten Tieren auch immunologisch defekte (dysgammaglobulinämische) Linien zur Verfügung stehen.

Unter dem Begriff Dysgammaglobulinämie versteht man ein mengenmäßig verschobenes Verteilungsmuster der drei bei warmblütigen Wirbeltieren hauptsächlich an der spezifischen humoralen Immunantwort beteiligten Antikörperisotypen : Immunglobulin G (IgG), Immunglobulin M (IgM) und Immunglobulin A (IgA). Das völlige Ausbleiben einer spezifischen Antikörperbildung nach der Provokation des Organismus durch einen antigenen Reiz wurde beim Menschen zuerst von GIEDON und SCHEIDEGGER im Jahr 1957 beschrieben, die diesen Immundefekt vielleicht zutreffender als Immunparese bezeichneten (ROSEN et al., 1968). In der vorliegenden Arbeit soll unter dem Terminus Dysgammaglobulinämie die Form einer Immunopathie verstanden werden, bei der anteilmäßige Verschiebungen der Antikörperisotypen im Serum vorliegen.

ROSEN et al. beschrieben 1968 einige Fälle von dysgammaglobulinämischen Patienten, deren gemeinsame Merkmale aus

stark reduzierten, bei manchen Patienten völlig fehlenden IgA-Serumspiegeln, bei gleichzeitig erniedrigten Serum-IgG-Werten bestanden. Diese Form einer Dysgammaglobulinämie, die vorwiegend bei männlichen Kindern in Erscheinung tritt, wurde später als Dysgammaglobulinämie vom Typ I bezeichnet. Durch einen niedrigen IgA- und IgM-Spiegel bei physiologischer IgG-Konzentration ist die sogenannte Dysgammaglobulinämie vom Typ II, deren geschlechtsgebundene genetische Ursache durch nahezu ausschließliches Auftreten bei männlichen Säuglingen vermutet wird, charakterisiert (SELL, 1977). Von allen sechs Möglichkeiten erniedrigter Spiegel einer der drei wesentlichen Immunglobulinisotypen im Kontext mit normalen oder erhöhten Serumwerten der beiden anderen stellt der selektive IgA-Mangel die beim Menschen am häufigsten auftretende Immundefizienz dar (HONG und AMMAN, 1972). Auf der Suche nach der Ursache des selektiven IgA-Mangels, als deren Möglichkeiten die Unfähigkeit IgA-bildender Zellen zur Ausschleusung der Antikörper (WALDMANN et al. 1976), die Unmöglichkeit IgA-tragender B-Lymphozyten sich zu normalen Mengen an IgA produzierenden Plasmazellen zu differenzieren (CASSIDY et al., 1979) und funktionelle Abnormalitäten im Bereich der die Immunantwort regulierenden T-Lymphozyten (WALDMANN et al., 1976; ATWATER und TOMASI, 1978; KING et al., 1979; SCHWARTZ, 1980) diskutiert werden, stellten DE LA CONCHA et al. (1982) fest, daß am Zustandekommen dieser Immunopathie mehrere der aufgezeigten Fehlleistungen gleichzeitig beteiligt sein müssen.

Der Umstand, daß sich aufgrund einer funktionellen und morphologischen Dissoziation der B- und T-Lymphozyten prägenden Systeme durch hormonelle Bursektomie zwischen dem dritten und siebten Bruttag beim Haushuhn eine

künstliche, in ihrer Form an die humane Dysgammaglobulinämie vom Typ I erinnernde Dysgammaglobulinämie erzeugen läßt (BRÜGGEMANN et al., 1969; FITZSIMMONS et al., 1973) und die Existenz zweier ingezüchteter Hühnerlinien mit einer erblichen Dysgammaglobulinämie (BRÜGGEMANN et al., 1967; BENEDICT et al., 1977) lassen diese Spezies als interessantes Studienobjekt für die oben beschriebenen humanen Immundefekte erscheinen.

Für die von BENEDICT beschriebene UCD-Hühnerlinie, welche sich durch erniedrigte IgG-Spiegel neben physiologischen bis erhöhten IgM- und IgA-Werten auszeichnet, werden T-Lymphozyten, die spezifisch die Synthese von 7 S Immunglobulinen zu supprimieren vermögen, gemeinsam mit degenerativen Bursaanomalien nachgewiesen (CHAN et al., 1980; ERIKSSON et al., 1982).

Die hier im Hause seit 1965 herangezüchtete (BRÜGGEMANN et al., 1967) und seit 1977 bezüglich des B-Blutgruppensystems, welches beim Huhn das funktionelle Äquivalent zum Majorhistokompatibilitätskomplex (MHC) der Mammalier darstellt, homozygote (B19) dysgammaglobulinämische Hühnerlinie (UM-B19; UM steht für Universität München) weist hinsichtlich des Verteilungsmusters der Serumimmoglobuline im Vergleich zu immunologisch intakten Kontrolltieren bei einem Teil der Nachkommen, den sogenannten permanent dysgammaglobulinämischen Hühnern, stark herabgesetzte, bei manchen Tieren nicht meßbare Serum IgG-Spiegel neben normalen bis stark erhöhten IgM-Werten und etwas über der Norm liegenden IgA-Konzentrationen auf, während der restliche Anteil der UM-B19 Hühner aufgrund physiologischer IgG- und IgM-Werte in Gegenwart leicht erhöhter IgA-Konzentrationen als normogammaglobulinämisch bezeichnet wird (LÖSCH et al., 1972; HERLYN et al., 1977; FIEDLER et al., 1980; FIEDLER et al., 1981; LÖSCH et al.,

1981)

Die funktionellen Grundlagen des Immundefektes der UM-B19 Hühner werden im Umfeld der T-Lymphozyten zum einen in einer Suppression des prinzipiell vorhandenen IgG Synthesesystems durch T-Zellen, experimentell durch passager erhöhte IgG-Spiegel nach Verabreichung von Levamisol, einem thymomimetischen Wirkstoff, welcher in Imbalancen in einem gestörten T-Suppressor / T-Helfer-Verhältnis regulierend einzugreifen vermag, nachgewiesen (STORANDT, 1983), und zum andern in einer gestörten Funktion der T-Helfer Lymphozyten, worauf die bei dysgammaglobulinämischen Hühnern im Vergleich zu Kontrolltieren verminderte Proliferation einer gemischten Lymphozytenpopulation nach Zugabe des T-Zell Mitogens Con A hinweist (PRÜGNER, 1982) vermutet. Im Umfeld der B-Lymphozyten wird als Ursache des Defektes eine subnormal funktionierende Bursa Fabricii, deren prägendem Einfluß die B-Zellen allein ihre volle immunologische Kompetenz verdanken (LERNER et al., 1971; KINCADE et al., 1973; LAWTON et al., 1975; MORIYRA, 1983) bzw. eine verzögerte Reifung der Bursa diskutiert, wofür das fehlende Auftreten von dysgammaglobulinämischen Nachkommen von Elterntieren mit diesem Immunglobulinmuster, sofern die Küken nach dem Schlupf noch mindestens 8 Tage im keimfreien Isolator gehalten werden, spricht. (KÜHLMANN et al., 1985) Es konnte bisher aber weder die genaue funktionelle bzw. morphologische Lokalisation der Ätiologie dieser Immunopathie nachgewiesen noch die Frage, ob die genotypische Expression zum Phänotyp des dysgammaglobulinämischen Tieres obligat ist oder ob lediglich eine Disposition, die durch Umwelteinflüsse zum Bild der Dysgammaglobulinämie führt, die genetische Komponente beim Entstehen der Immunkrankheit ist, beantwortet werden.

Seit alten Zeiten und in verschiedenen Kulturkreisen

werden bestimmte pflanzliche Drogen zur Unterstützung der körpereigenen Abwehr bei drohenden oder bereits manifesten Infektionskrankheiten erfolgreich eingesetzt. Da in jüngerer Zeit viele Untersuchungen durchgeführt worden sind, ein empirisch festgestelltes Augment der Körperabwehrkräfte dieser Drogen durch Messen objektiver immunologischer Parameter zu verifizieren, stellte sich die Frage, ob bei gesunden Probanden als pharmakologisch wirksam befundene pflanzliche Abwehrstimulantien bei dysgammaglobulinämischen Tieren ebenfalls zu einer Verbesserung des immunologischen Status führen, oder ob sie eventuell eine vorübergehende Restaurierung des Immundefektes bewirken.

Der in diesem Zusammenhang oft gebrauchte Begriff des Immunstimulans ist indessen problematisch, da unter dem Begriff Immunität einerseits die durch B-Zellklonierung verursachte Bildung spezifischer Antikörper (humorale Immunität) und andererseits die durch Antigenreiz provozierte T-Zellklonierung zu spezifischen Effektorzellen (zelluläre Immunität) verstanden wird und der Angriffspunkt der pflanzlichen Drogen in der phylogenetisch älteren Abteilung des Abwehrsystems, der sogenannten Resistenz, die durch die Aktivität von Mikro- und Makrophagen, Interferon, des Komplement-Opsonin-Propertidin-Systems, Natural-Killer-Zellen u. a. imponiert, vermutet wird (MAYR, 1984; HÄNSEL, 1981). Durch die antigenunspezifische Stimulierung von Makrophagen und T-Lymphozyten wird die Antigenakkumulation, -verarbeitung, und -weitergabe jedoch potenziert, womit, wenn auch indirekt, eine gewisse immunstimulierende Wirkung der pflanzlichen Drogen erwartet werden darf, wodurch auch der Terminus Immunstimulans für primär resistenzfördernde Phytopharmaka eine Berechtigung erfährt.

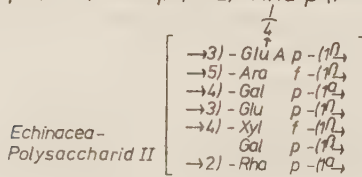
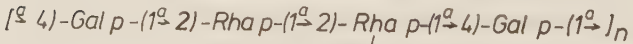
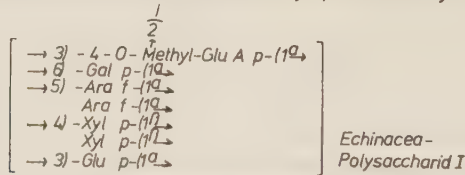
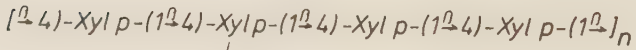
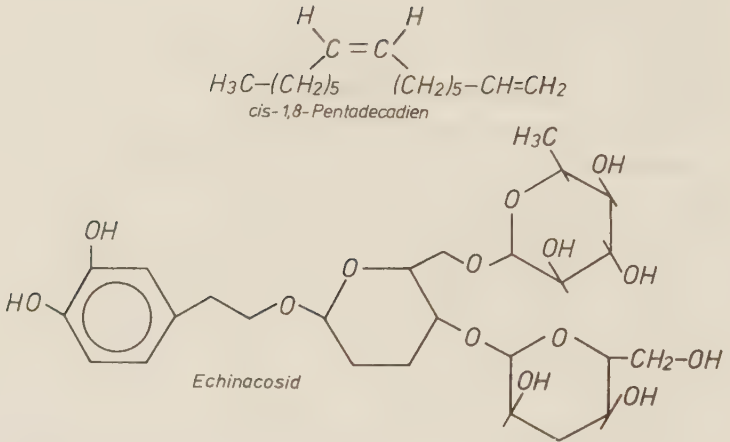


Abb. 1 Inhaltstoffe von Echinacea mit bekanntem pharmakologischem Wirkungsspektrum

Die neben *Aristolochia* hinsichtlich ihrer klinischen Anwendung als Abwehrstimulans bedeutsamste Arzneipflanze, *Echinacea* (*E. purpurea*, Roter Sonnenhut; *E. angustifolia*, Schmalblättriger Sonnenhut) bildet das wirksame Grundgerüst vieler, unter der Rubrik Immunstimulans geführter, biologischer Arzneimitteltzubereitungen, deren therapeutisches Spektrum oft durch die Zugabe weiterer pflanzlicher Reiztherapeutika zu spreizen versucht wird. Auf der Suche nach den Wirkprinzipien dieser, aus der nordamerikanischen Volksmedizin stammenden Pflanze wurde eine Erhöhung des Serumproperdinspiegels bei Kaninchen (BÜSING, 1958) und Mäusen (GRAEVENITZ und HUSMANN, 1960), die Stabilisierung der interzellulären Kittsubstanzen durch Hemmung der körpereigenen und bakteriellen Hyaluronidase (BÜSING, 1952; BÜSING, 1958), die beschleunigte Proliferation von Leukozyten nach strahleninduzierter (GERHARDT, 1972) und durch Zytostatika verursachter Suppression (FÜRSTENBERG, 1964), eine Stimulierung der Phagozytose (WAGNER, 1983) sowie eine interferonähnliche antivirale Aktivität (WACKER und HILBIG, 1978) beschrieben. Große Unsicherheit herrscht dagegen über die Zuordnung einzelner pflanzlicher Inhaltstoffe zu den spezifischen Wirkungen von *Echinacea*: Das cis-1, 8-Pentadecadien soll onkolytische Wirkung besitzen, während das Echinacosid das Wachstum von *Staphylococcus aureus* zu hemmen vermag (HARNISCHFEGGER et al., 1980); schließlich werden zwei von WAGNER (1983) beschriebene Polysaccharide für die Phagozytosesteigerung verantwortlich gemacht.(Abb.1)

Der Einfluß von Äthanol auf das Abwehrsystem des tierischen Organismus manifestiert sich den Angaben in der Literatur zufolge in hohem Maße heterogen: Bereits bei niedrigen Alkoholkonzentrationen (0.02%) fanden RISTOW et al. (1982) die Zytotoxizität von Natural-Killer-Zel-

len von Maus und Ratte herabgesetzt und als Ursache wurde eine konzentrationsabhängige Bindungshemmung der Effektor- an die Zielzelle diskutiert. STACEY (1984) beobachtete bei ähnlich aufgebauten Versuchen erst ab einer Äthanol- konzentration von 0.4% eine signifikante Hemmung der zyto- toxischen Aktivität der Natural-Killer-Zellen, während RICE et al. (1983) bei einer Alkoholkonzentration von 0.64% eine optimale Steigerung der Natural-Killer-Aktivität fan- den. Die Lymphozytentransformation und das Wachstum von Granulozytenkolonien wird in vitro bei einer Äthanolkon- zentration von 0.1% deutlich unterdrückt (TISMAN und HER- BERT, 1973; ATKINSON et al., 1977; LIU, 1980). Ebenso zeigte sich bei in vitro-Versuchen mit Alveolarmakrophagen vom Kaninchen eine bei einer Alkoholkonzentration von 0.1% beginnende, dosisabhängige und nur vorübergehende (60 Minuten) Supression der Phagozytose von Latexparti- keln, die vor allem auf eine reduzierte Adhärenz der Ma- krophagen an die Partikel zurückgeführt wurde (RIMLAND und HAND, 1980). Die Verabreichung toxischer Äthanoldosen führte bei Mäusen nach Inhalation von Staphylococcus au- reus im Gegensatz zu Kontrolltieren nicht zu einer Zunahme der Anzahl von Alveolarmakrophagen (GUARNERI und LAUREN- ZI, 1968) und bei Ratten zu einer signifikanten Depres- sion der Clearance von mikroaggregiertem Fremdalbumin (ALI und NOLAN, 1967). Eine dualistische Wirkung von Alkohol vermuten KENDALL und TARGAN (1980), die in vitro bei niedrigen bis moderaten Äthanolkonzentrationen eine gesteigerte Natural-Killer-abhängige Zytotoxizität fest- stellten. Sie diskutieren einen biphasischen Punkt der Alkoholkonzentration bei 0.01% - 0.2%, bei dessen Über- bzw. Unterschreiten sich die Wirkung ins Konträre ändert. Auf eine abwehrrkäftigende Wirkung niedriger Alkoholdosen weisen die Ergebnisse von HALLENGREN und FORSGEN (1978), die in vitro in Gegenwart einer Äthanolkonzentration von

0.16% eine signifikante Steigerung der Chemotaxis bzw. von 0.02% eine signifikante Steigerung der Adhärenz von humanen polymorphkernigen Granulozyten fanden, hin. Außerdem führte bei Meerschweinchen eine mehrmalige Applikation von Alkohol zu einem gegenüber einer Kontrollgruppe signifikanten Anstieg der Gesamtimmunglobulinkonzentration (CAIAZZA und OVARY, 1976).

Nachdem bisher unveröffentlichte, im Haus durchgeführte Untersuchungen an immunologisch unauffälligen Hühnern einen positiven Effekt des als Hauptbestandteil *Echinacea angustifolia* enthaltenden Präparates INFLUEX¹ hinsichtlich der Bildung von Immunglobulinen und gegen das gleichzeitig verabreichte Antigen Humanserumalbumin (HSA) gerichteten spezifischen Antikörpern gezeigt hat und im Zusammenhang mit diesen Untersuchungen eine nahezu adäquate Wirkung von Äthylalkohol, welcher in INFLUEX das Lösungsmittel für die pflanzlichen und tierischen Inhaltsstoffe darstellt, zur Beobachtung gebracht werden konnte, soll in dieser Arbeit die Wirkung von INFLUEX auf die Immunantwort dysgammaglobulinämischer UM-B19-Hühner untersucht und der Einfluß von Äthylalkohol auf das Abwehrsystem von immunologisch intakten, genuin dysgammaglobulinämischen, agammaglobulinämischen und gnotobiotischen Hühnern weiter verfolgt werden.

¹ Hersteller: Steigerwald Arzneimittelwerk, Havelstraße 5, 6100 Darmstadt

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Tiermaterial

Für die Untersuchungen wurden Tiere aus folgenden Gruppen verwendet:

a) Immunologischintakte Heisdorf-Nelson-Lohmann Junghähne als Kontrolltiere für die Bestimmung der Immunglobuline und der spezifischen Antikörper sowie für die Beurteilung der Phagozytoseleistung.

b) Dysgammaglobulinämische UM-B19 Junghühner beiderlei Geschlechts für die Bestimmung der Serumimmunglobulingehalte und der spezifischen Antikörper bzw. für die Untersuchung der Phagozytoseleistung. Bei diesen Hühnern liegen erhöhte IgM- und IgA-Serumkonzentrationen bei stark erniedrigten bzw. unter der Nachweisgrenze der beschriebenen Methoden liegenden IgG-Serumkonzentrationen vor.

Die dysgammaglobulinämischen Tiere entstammen einer Hühnerlinie, die im hiesigen Institut seit 1965 herausgezüchtet wurde (LÖSCH, 1972) und die seit 1977 bezüglich des Histokompatibilitätslocus homozygot ist. Sie wird seit 1980 "UM-B19-Linie" genannt, wobei UM für Universität München steht. (Fiedler et al., 1980)

c) Keimfrei bebrütete und aufgezogene (gnotobiotische) HNL-Tiere beiderlei Geschlechts im Alter von 6 Wochen.

d) Agammaglobulinämische Tiere beiderlei Geschlechts im Alter von 5 Monaten. Diese Tiere waren am 3. Bruttag mit Testosteronpropionat und am 1. bis 3. Lebenstag mit Cyclophosphamid behandelt worden. Die Tiere dieser Gruppe wiesen zum Zeitpunkt der Untersuchungen Serumimmunglobulinge-

halte von < 0.001 mg / ml auf.

Die Tiere der Gruppen a), b) und d) wurden in kleinen Gruppen auf Gitterrosten gehalten, sie erhielten Jung-hennenalleinfutter G7J (Bayerische Kraftfutter, Rosenheim) und Trinkwasser ad libitum. Die keimfreien Tiere wurden unter adäquaten Bedingungen in einem sterilen Isolator gehalten (MERKENSCHLAGER et al., 1967)

2.2 Antigen

Die Immunisierung erfolgte mit Humanserumalbumin (HSA) der Fa. SIGMA, Taufkirchen.

2.3. Prüfsubstanzen

Als Prüfsubstanzen bezüglich ihrer immunologischen Wirkung wurden herangezogen

a) eine 37 Vol%ige Lösung von Äthanol in aqua dest.
(im Text: Alkohol)

b) INFLUEX, von der Fa. Steigerwald, Darmstadt, freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die Inhaltstoffe von 100 ml INFLUEX setzen sich zusammen aus :

Aconitum nap.	D 4	15 ml
Apis mell.	D 3	10 ml
Echinacea angust.	Ø	30 ml
Lachesis	D 6	30 ml

Lösungsmittel für die Wirkstoffextrakte ist eine 37 Vol%ige Äthanollösung; in 1 ml INFLUEX sind 7,5 ug Echinacosid enthalten. (im Text: INFLUEX in alkohol. Lösung)

c) eine von der Fa. Steigerwald für diese Versuche hergestellte entalkoholisierte Lösung von INFLUEX (im Text: INFLUEX in wässriger Lösung)

2.4 Immunisierung

Die Tiere wurden am Tag 0 immunisiert. Das in einer Konzentration von 40 mg/ml in 0,9%iger Kochsalzlösung gelöste HSA wurde in einer Dosierung von 40 mg/kg Körpermasse intravenös in die V. ulnaris (Kontrolltiere und dysgammaglobulinämische Tiere) bzw. intramuskulär auf beide Oberschenkel verteilt (keimfreie Tiere) injiziert. Von der Dosis 40 mg/kg Körpermasse des T-Zell-abhängigen Antigens HSA ist bekannt, daß sie zu starker Antikörperbildung führt.

2.5. Verabreichung der Prüfsubstanzen

Die Applikation der Prüfsubstanzen Äthanol, INFLUEX und INFLUEX in äthanolfreier Suspension erfolgte in einer Dosis von 0,1 ml/kg Körpermasse peroral in den Kropf. Dies geschah mittels 1 ml Kunststoffpipetten für den Einmalgebrauch (Fa. Falcon) bzw. mit Einmal-Tuberkulinspritzen bei den keimfrei gehaltenen Tieren. Die Kontrolltiere bekamen auf dem gleichen Weg die adäquate Menge Leitungswasser verabreicht.

2.6. Serumgewinnung

Das aus der V. ulnaris entnommene Blut wurde bei 37 Grad C 45 min inkubiert und anschließend über Nacht bei 4 Grad C aufbewahrt. Nach Zentrifugation für 10 min mit 1800 g wurde das Serum abpipettiert und durch eine zweite 10 min dauernde Zentrifugation mit 1800 g von den letzten Resten der zellulären Blutbestandteile getrennt und dann in Polystyrolröhrchen bei -20 Grad C eingefroren.

2.7. Antiseren

Die vom Kaninchen stammenden H-kettenspezifischen Antiseren wurden wie bei SCHRANNER und LÖSCH (1986) beschrieben hergestellt.

2.8. Rocket Immunelektrophorese

Die quantitative Bestimmung der Serumimmunglobuline erfolgte mit der Rocket Immunelektrophorese nach Laurell (1966). Die Elektrophorese wurde mit Multiphor-Kammern (Fa. LKB) in einem Gel mit isotypspezifischem Antiserum vom Kaninchen bei 1-2 V/cm über Nacht (16-18 Stunden) durchgeführt. Als Elektrolyt in den Kammern diente Tris-Barbiturat-Puffer, pH 8,6¹ der im Verhältnis 1:4 mit aqua bidest verdünnt wurde. Die Gelmatrix bestand aus 1%iger Agarose L ($m_r = 0,02$; Fa.LKB) in 1:5 mit aqua bidest.verdünntem Tris-Barbiturat-Puffer. Das Agarose-Puffer-Gemisch wurde bis zum Sieden erhitzt und anschließend bis zur Zugabe des Antiserums im Wasserbad bei ca. 58 Grad C flüssig gehalten. Von der Agaroselösung wurden 12

ml in ein Reagenzgläschen pipettiert und 250 μ l des jeweiligen isotypspezifischen Antiserums zugesetzt. Mit der antiserumhaltigen Agarose wurde eine 10 cm x 8,5 cm große, auf einer horizontalen Arbeitsplatte liegende Folie (Gel Bond-Film, Fa. Johnson) auf der hydrophilen Seite gleichmäßig begossen, so daß die Antiserumkonzentration für alle drei Isotypen 3 μ l pro cm^2 betrug. Nach der Gelierung wurden, ca. 1,5 cm vom unteren Folienrand entfernt, 15 Löcher in die Agarose gestanzt. In 5 dieser Löcher wurden mit einer Hamilton-Spritze je 5 μ l verschiedener Verdünnungen eines Serums mit bekanntem Gehalt an IgG, IgM und IgA als Standard gefüllt. In die restlichen 10 Löcher wurden je 5 μ l einer Probe ebenfalls in unterschiedlicher Verdünnung gegeben. Dabei wurden die Verdünnungen des Standards und der Proben so gewählt, daß die Peaks mit einer Höhe zwischen ca. 1 cm und 5 cm erschienen. Auf eine Folie kamen immer die Serumproben von einem Tier mit 2 Verdünnungen pro Blutentnahmezeitpunkt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Folien eine Stunde in 0,9 % iger NaCl-Lösung gewässert, anschließend ca. 30 min zwischen Zellstoff gepreßt und im Heißluftstrom getrocknet. Die trockenen Folien wurden etwa eine Stunde in der Färbelösung² gefärbt, unter fließendem Wasser abgespült und zuletzt in der Entfärbelösung³ so lange entfärbt bis sich die Peaks deutlich vom Hintergrund abhoben. Nach erneuter Trocknung wurde die Höhen der Peaks gemessen.

Die Auswertung erfolgte mit einem Computer (KAYPRO 2) Dem Computer wurden die Höhen der Peaks des Standards und der Proben sowie die Gehalte an Immunglobulinisotypen der entsprechenden Standardverdünnungen eingegeben. Mittels der linearen Regression zeichnete sich der Computer aus den Standardverdünnungen die ideal liegende Eichgerade, auf der die Proben abgelesen wurden. Ausgewertet wurden

nur Folien, auf denen der Regressionskoeffizient der Eichgeraden größer oder gleich 0,97 war. Das Ergebnis wurde direkt mit dem Gehalt an Immunglobulin in mg/ml ausgedruckt. Zum besseren Vergleich der mit unterschiedlichen Prüfsubstanzen behandelten Gruppen wurden die Immunglobulingehalte in Prozent ausgedrückt, wobei die Immunglobulinkonzentrationen jeder Gruppe am Behandlungsbeginn jeweils gleich 100 % gesetzt wurden.

1 Tris-Barbiturat-Puffer:

112,00 g Diäthylbarbitursäure

221,50 g Tris (hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)

2,66 g Calciumlactat

3,25 g Natriumacid

ad 5 l aqua bidest

Der pH wird nötigenfalls mit HCl auf 8,6 eingestellt.

2 Färbelösung

450 ml Äthanol (96 %ig)

100 ml Essigsäure

450 ml aqua bidest

5 g Coomassie Brilliant Blue 250

3 Entfärbelösung

250 ml Äthanol (96 %ig)

100 ml Essigsäure

450 ml aqua bidest

2.9. Affinitätschromatographie an Sepharose 4B

Zur Isolierung der Anti-HSA Antikörper aus einem Anti-HSA Serumpool wurde die Affinitätschromatographie (LOWE und DEAN, 1974) verwendet. Hierbei wurde wie bei UEBEL (1984) beschrieben vorgegangen.

2.10. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Die quantitative Bestimmung der isotypischen Anti-HSA Antikörper wurde mit dem "Enzyme-linked immunosorbent assay" (ELISA) nach ENGWALL und PERLMANN (1972), modifiziert nach der von KÜHLMANN et al. (1985) beschriebenen Methode durchgeführt. Zur Verwendung kamen "Immuno-Plate-II" Platten der Firma Nunc (Nunc, Kamstrup)

Auswertung der Ergebnisse

In Anlehnung an CAULFIELD und SHAFFER (1984) wurde ein Computerprogramm zur Auswertung des ELISA hergestellt. Auf jeder Platte wurde neben den zu untersuchenden Serumproben ein Standard zugegeben, dessen Gehalt an isotypspezifischen Anti-HSA Antikörpern durch Reinigung an der HSA Affinitätschromatographiesäule und anschließender Bestimmung der isotypischen Antikörper (Anti-HSA IgG-, Anti-HSA IgM- und Anti-HSA IgA Antikörper) mit der Rocket-Immunelektrophorese bekannt war. Durch den Vergleich der genauen Verdünnungsstufe bei der eine Extinktion von 0.1 gegenüber dem nicht umgesetzten Substrat der Serumprobe einerseits und des Standards andererseits erreicht wurde, läßt sich der Gehalt an Anti-HSA IgG-, Anti-HSA IgM- und Anti-HSA IgA-Antikörpern der Probe bestimmen. Die Berechnung der genauen Verdünnungsstufe bei der eine Ex-

tinktion von exakt 0.1 erreicht wird, errechnet der Computer durch Interpolation zwischen den zwei Verdünnungsstufen, bei der eine optische Dichte von gerade über 0.1 und gerade unter 0.1 erhalten wird. Die Berechnung erfolgt nach der Formel

$$t = x - (0.1 - L) / (H - L)$$

wobei t die genaue Verdünnungsstufe bei der eine Extinktion von 0.1 erhalten wird

L der Extinktionswert der Verdünnungsstufe bei der eine optische Dichte von gerade unter 0.1 erhalten wird

H der Extinktionswert der Verdünnungsstufe bei der eine optische Dichte von gerade über 0.1 erhalten wird

x die Verdünnungsstufe mit der optischen Dichte L

ist. Obwohl durch die Wahl eines niedrigen Extinktionswertes von 0,1 als cut-off Punkt die Affinitätsdifferenzen verschiedener Antikörper berücksichtigt worden sind, wurden die Gehalte an Anti-HSA Antikörpern in ELISAEINHEITEN angegeben. Eine ELISAEINHEIT entspricht einem ug/ml Anti-HSA Antikörper des affinitätsgereinigten Standards.

2.11. Carbon-Clearance-Test

Zur Beurteilung der in vivo Phagozytoseleistung der sesshaften Makrophagen des Retikuloendothelialen Systems (RES) wurde der von BIOZZI et al.(1953) inaugurierte Carbon-Clearance Test herangezogen. Das Prinzip dieses

Testes besteht darin, daß intravenös inkorporierte Kohlepartikel von den ortsansässigen Makrophagen vor allem der Milz und der Leber phagozytiert werden und somit der zeitliche Verlauf der Reinigung des Blutes von den Kohle-
teilchen als Maß für die Makrophagenaktivität dient.

Ausführung des Versuches

Die Kohlepartikel, deren Größe für diesen Versuch 250 Å betragen soll, entstammen dem Rußanteil einer Zeichentuschezubereitung, Art. Nr. 591 017 der Fa. Rotring, Hamburg. Nach Angaben der Herstellerfirma (persönl. Mitteilung) setzt sich die Tusche folgendermaßen zusammen:

Wasser	ca. 70-80 %
Schellacklösung	ca. 5- 8 %
Schutzkolloid	ca. 5- 8 %
Ruß	ca. 8-11 %
Feuchthaltemittel	ca. 8-11 %
Konservierungsmittel	< 1 %

Es wurde von einem durchschnittlichen Gehalt von 10 % Kohle ausgegangen. Die Tusche wurde mit einer 1 %igen Lösung von Gelatine in physiologischer Kochsalzlösung so verdünnt, daß man auf einen Kohlegehalt von 16 mg/ml kam. Diese Tuschezubereitung diente, auf 40 Grad C erwärmt, als Injektionsflüssigkeit.

Vor Beginn des Versuches wurde das Huhn gewogen, auf dem Arbeitstisch fixiert und die Umgebung der beiden Venae ulnares grob von Federn befreit. Daraufhin erfolgte die Punktion der rechten Flügelvene mit einer Kanüle Nr.1 (0.90 x 38 mm), 25 µl austretendes Blut wurde mit Hilfe einer Kapillare (Einmal-Mikropipette, 25 µl, Fa. Brand, Cat. Nr. 708722), die direkt in den Konus der Kanüle gehalten wurde, gewonnen und sofort in 2 ml aqua dest. bei

intensivem Schütteln hämolysiert. Auf die Kanüle wurde über einen selbstkonstruierten, etwa 30 cm langen Kunststoffschlauch eine Kunststoffspritze aufgesetzt, in der sich die zu applizierende Tuschesuspension befand. Die Injektion erfolgte in einer Dosierung von 5 ml/kg Körpermasse gleichmäßig mit einer Geschwindigkeit von etwa 10 ml/min. Nach beendeter Injektion wurde die Uhrzeit festgestellt und nach 1, 2, 3, 5, 7 und 9 Minuten jeweils die linke Flügelvene mit einer Kanüle Nr.20 (0.40 x 20 mm) punktiert. Austretendes Blut wurde wie oben beschrieben gewonnen und hämolysiert. Die Hühnerbluthämolysate wiesen eine schon mit bloßem Auge wahrnehmbare Trübung auf, so daß sie in dieser Form nicht photometrisch gemessen werden konnten. Aus diesem Grund wurden die Proben nach der Hämolysen noch 90 min mit 18 g zentrifugiert, woraufhin neben einem klaren Überstand eine geringe Menge an Bodensatz, der nach mikroskopischer Untersuchung aus Zelltrümmern bestand, erhalten wurde. Die Kohlepartikel verblieben beim Zentrifugieren mit dieser Umdrehungszahl im klaren Überstand, was durch photometrische Messung derart zentrifugierter Hämolysate, denen vorher bekannte Mengen an Tusche zugegeben worden waren, festgestellt werden konnte. Die klaren Überstände wurden bei einer Wellenlänge von 650 nm photometrisch untersucht, wobei als Nullwert die vor der Tuscheinjektion gewonnene Probe diente.

Auswertung der Ergebnisse

Es zeigten sich mit zunehmendem Abstand vom Zeitpunkt der Injektion abfallende Extinktionswerte der Hämolysate. Wie bei BIOZZI et al. (1953) beschrieben, wurden in Diagrammen zum einen die absoluten Extinktionswerte und zum anderen die logarithmierten optischen Dichten gegen die Zeit

aufgetragen. Dabei ergab sich eine lineare Abhängigkeit der logarithmischen Extinktionswerte von der Zeit. Die Steigung der so durch lineare Regression (Regressionskoeffizienten zwischen 0.97 und 0.99) erhaltenen Geraden ist ein Maß für die Elimination der Kohleteilchen aus dem Blut und somit für die Phagozytose der sessilen Makrophagen und wird daher als Phagozytoseindex bezeichnet. (Abb. 2a, 2b)

Aufgrund nicht unbedeutender täglicher, ja tageszeitlicher Schwankungen der individuellen Phagozytoseindices wurde mit jeder behandelten Gruppe eine unbehandelte (Wasserapplikation) zum gleichen Zeitpunkt untersucht. Durch den Vergleich der Phagozytoseindices von Kontroll- und Prüfgruppe beurteilte man Wirkung der jeweiligen Substanz. Hierzu wurde hinsichtlich einer besseren Übersichtlichkeit die Angabe in Prozent gewählt, wobei die Kontrollgruppe gleich 100 % gesetzt wurde.

Für die hilfreichen Ratschläge zur Durchführung des Carbon-Clearance-Testes bedanke ich mich bei Frau Dr. K. Jurcic aus dem Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität München (Vorstand: Prof. Dr. H. Wagner).

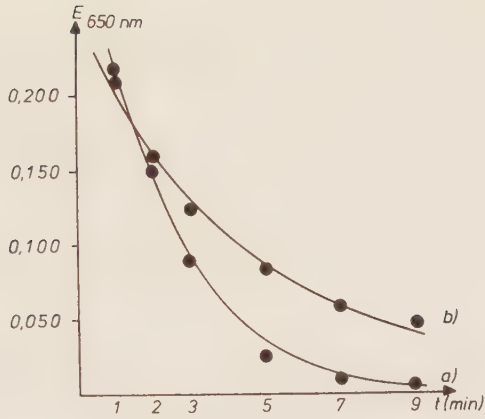


Abb. 2a Abhängigkeit der absoluten Extinktionswerte von der Zeit. Dargestellt ist ein Tier mit hoher (a) und niedriger (b) Makrophagenaktivität.

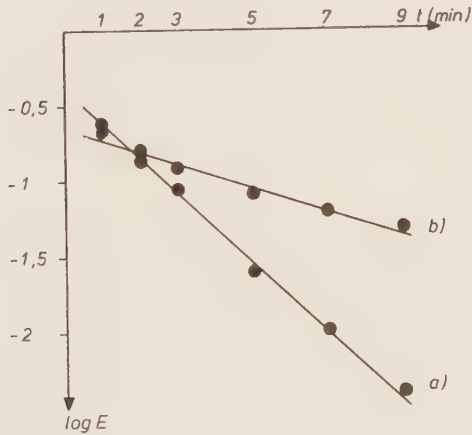


Abb. 2b Abhängigkeit der logarithmischen Extinktionswerte von der Zeit. Dargestellt ist ein Tier mit hoher (a) und niedriger (b) Makrophagenaktivität.

2.12. Versuchsablauf

Zur Verfolgung der Immunglobulinkonzentrationen und der spezifischen Antikörper wurde den Tieren vor der Behandlung Blut genommen. Anschließend erfolgte die orale Verabreichung der Prüfsubstanzen Alkohol und INFLUEX bzw. des Wassers und 30 min später wurden die Tiere mit HSA immunisiert. Die weiteren Blutentnahmen erfolgten nach 5, 8, 14 und 21 Tagen bei den keimfrei gehaltenen Tieren bzw. nach 8, 14 und 21 Tagen bei den Kontroll- und UM-B19-Hühnern.

Zum Bestimmen der Phagozytoseindices wurden die Tiere ca. 24 Stunden vor der Durchführung Carbon-Clearance-Testes mit den Prüfsubstanzen oral vorbehandelt.

2.13. Statistische Methoden

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte nach SACHS (1976). Zum Vergleich zweier empirischer Mittelwerte von normalverteilten Grundgesamtheiten wurde der Student-Test (t-Test) verwendet.

3. ERGEBNISSE

3.1. Serumimmunglobulin- und Anti-HSA Antikörperkonzentrationen

3.1.1. Kontrolltiere

3.1.1.1. Serum-IgG-Konzentration nach Injektion von HSA und oraler Verabreichung von Wasser (n = 7) bzw. Alkohol (n = 8; Abb. 3)

Bei den mit Wasser behandelten Tieren steigt die IgG-Konzentration am 8. Tag nach der HSA-Injektion kräftig an, um am Tag 14 wieder etwa den Ausgangswert zu erreichen und bis zum 21. Tag erneut etwas zu steigen.

Die Serum-IgG-Konzentration nach Alkoholverabreichung steigt bis zum 8. Tag auf etwa gleiche Höhe wie die Wassergruppe an. Danach fällt sie kontinuierlich auf etwa den Ausgangswert am 14. Tag bzw. unter den Ausgangswert am 21. Tag.

3.1.1.2. Serum-IgM-Konzentration nach Injektion von HSA und oraler Verabreichung von Wasser (n = 7) bzw. Alkohol (n = 8; Abb. 4)

Nach Wasserverabreichung steigt der IgM-Gehalt im Serum der HSA-injizierten Tiere deutlich an, fällt dann analog zum IgG-Gehalt dieser Gruppe am Tag 14 auf etwa den Ausgangspunkt zurück, in dessen Nähe er auch noch am 21. Tag zu finden ist. Analogien zum IgG-Verlauf zeigen auch die IgM-Spiegel der Alkoholgruppe : Nach einem deutlichen Anstieg an Tag 8 fällt auch die IgM-

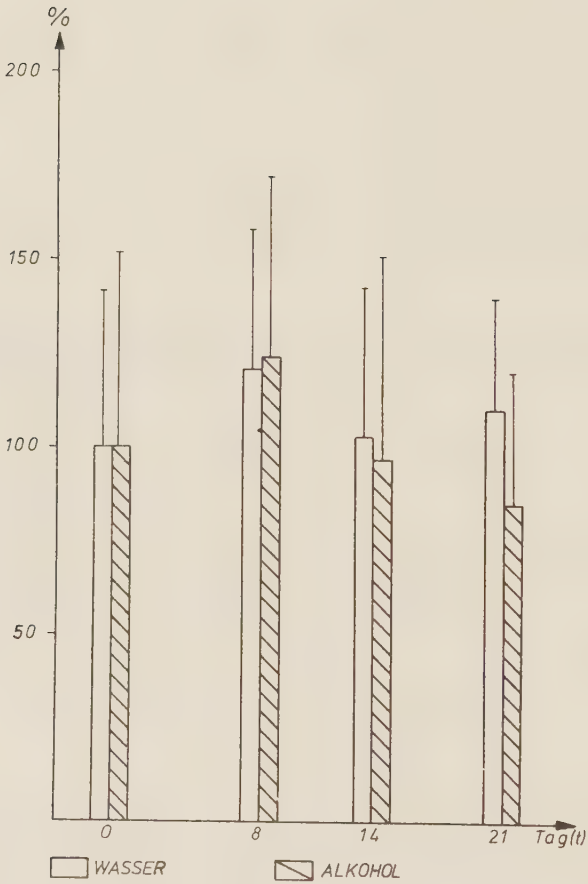


Abb. 3 Serum-IgG-Konzentration von Kontrollhühnern nach Injektion von HSA und oraler Verabreichung von Wasser bzw. Alkohol

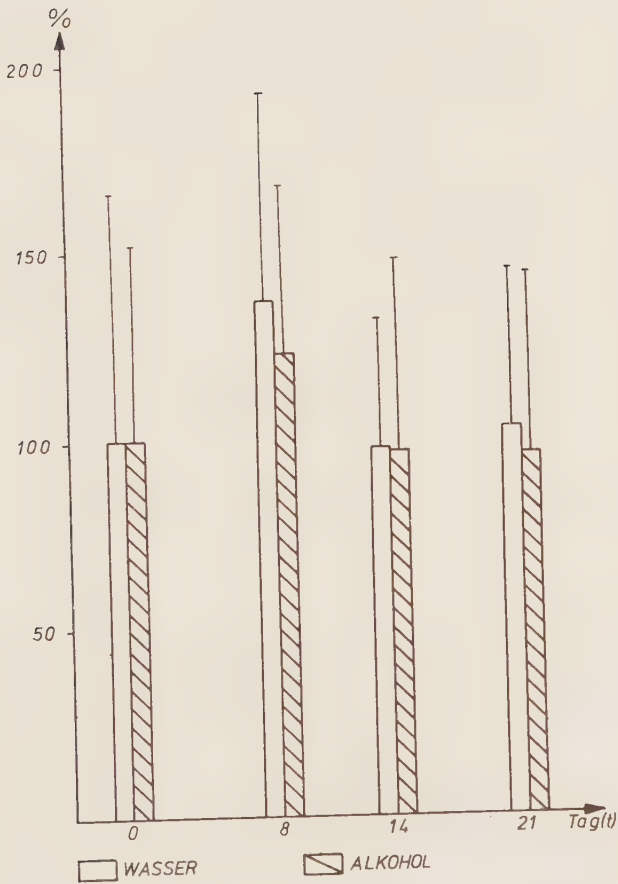


Abb. 4 Serum-IgM-Konzentration von Kontrollhühnern nach Injektion von HSA und oraler Verabreichung von Wasser bzw. Alkohol

Konzentration am Tag 14 auf etwa den Ausgangswert ab, wo sie bis zum Tag 21 bleibt .

3.1.1.3. Serum-IgA-Konzentration nach Injektion von HSA und oraler Verabreichung von Wasser (n = 7) bzw. Alkohol (n = 8; Abb. 5)

Acht Tage nach der HSA-Injektion sinkt der IgA-Spiegel der mit Wasser behandelten Tiere etwas unter den Ausgangswert ab, während die Alkoholgruppe ihren Wert kaum ändert. Nach 14 Tagen sind die IgA-Konzentrationen bei beiden Gruppen unter den Ausgangswert abgesunken. Drei Wochen nach der HSA-Injektion steigen bei beiden Gruppen die IgA-Konzentrationen wieder etwas an, ohne jedoch die Werte des Tages 0 zu erreichen.

3.1.1.4. Anti-HSA IgG-Konzentration nach Injektion von HSA und oraler Verabreichung von Wasser (n = 7) bzw. Alkohol (n = 8; Abb. 6)

Vor der HSA-Injektion weisen beide Gruppen keine Anti-HSA IgG-Antikörper auf. Bis zum Tag 8 sind bei beiden Gruppen hohe Werte an Antikörperkonzentration festzustellen, die dann bei beiden Gruppen kontinuierlich bis zum Tag 21 wieder abfallen. Dabei liegen die Werte der Tiere mit Wasserverabreichung am 8. und 14. Tag etwas höher als die der mit Alkohol behandelten Tiere. Am Tag 21 liegen die Werte beider Gruppen etwa gleich.

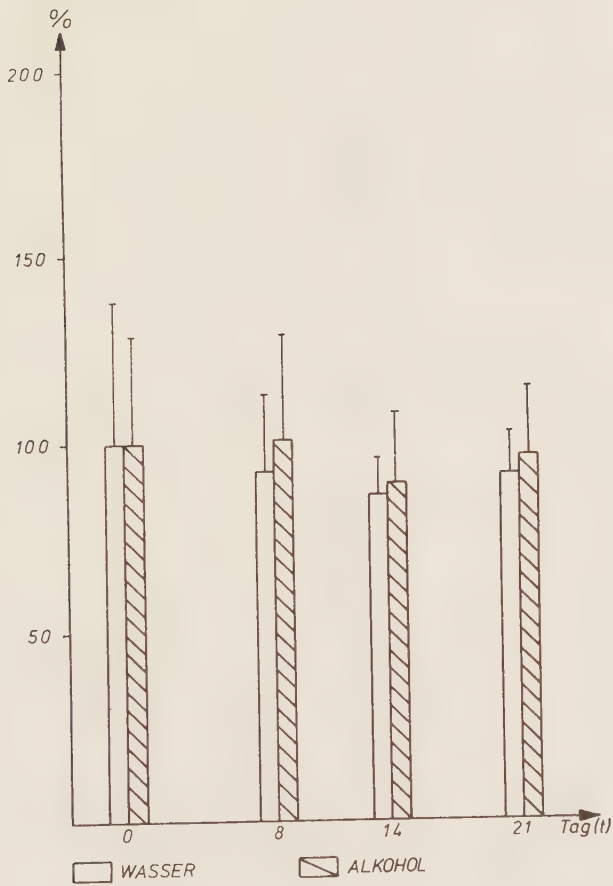


Abb. 5 Serum-IgA-Konzentration von Kontrollhühnern nach Injektion von HSA und oraler Verabreichung von Wasser bzw. Alkohol

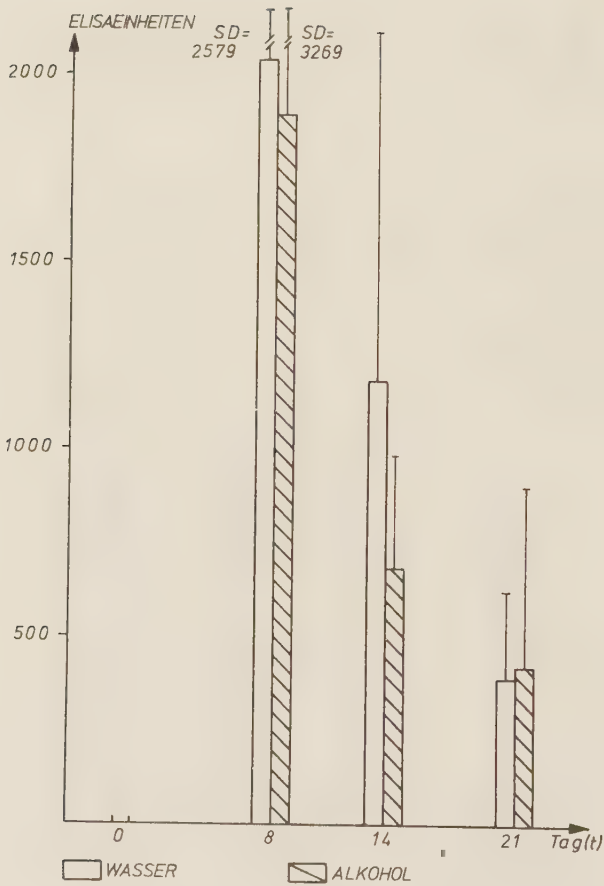


Abb. 6 Anti-HSA IgG-Konzentration von Kontrolltieren nach Injektion von HSA und oraler Verabreichung von Wasser bzw. Alkohol

3.1.1.5. Anti-HSA IgM-Konzentration nach Injektion von HSA und oraler Verabreichung von Wasser (n = 7) bzw. Alkohol (n = 8; Abb. 7)

Vor der HSA-Injektion sind bei allen Tieren beider Gruppen geringe Mengen an IgM-Antikörpern nachweisbar. Bei beiden Gruppen steigt die Anti-HSA IgM-Antikörperkonzentration bis zum Tag 8 auf etwa gleiche Höhe an um bis zum 21.Tag wieder kontinuierlich abzufallen.

3.1.1.6. Anti-HSA IgA-Konzentration nach Injektion von HSA und oraler Verabreichung von Wasser (n = 7) bzw. Alkohol (n = 8; Abb.8)

Beide Gruppen weisen vor der HSA-Injektion keine meßbaren Anti-HSA IgA-Antikörper auf. Bis zum Tag 8 bilden alle Tiere, die mit Alkohol behandelt wurden und bis auf eine Ausnahme auch alle Tiere der mit Wasser behandelten Gruppe IgA-Antikörper. Dabei liegt der Durchschnittswert der Alkoholgruppe mehr als doppelt so hoch wie derjenige der Wassergruppe. Diese Diskrepanz wird zwei Wochen nach der HSA-Injektion noch deutlicher: Bei nur noch einem Drittel der mit Wasser behandelten Tiere sind Anti-HSA IgA-Antikörper nachweisbar, während bis auf eine Ausnahme bei allen Tieren der Alkoholgruppe noch meßbare Anti-HSA

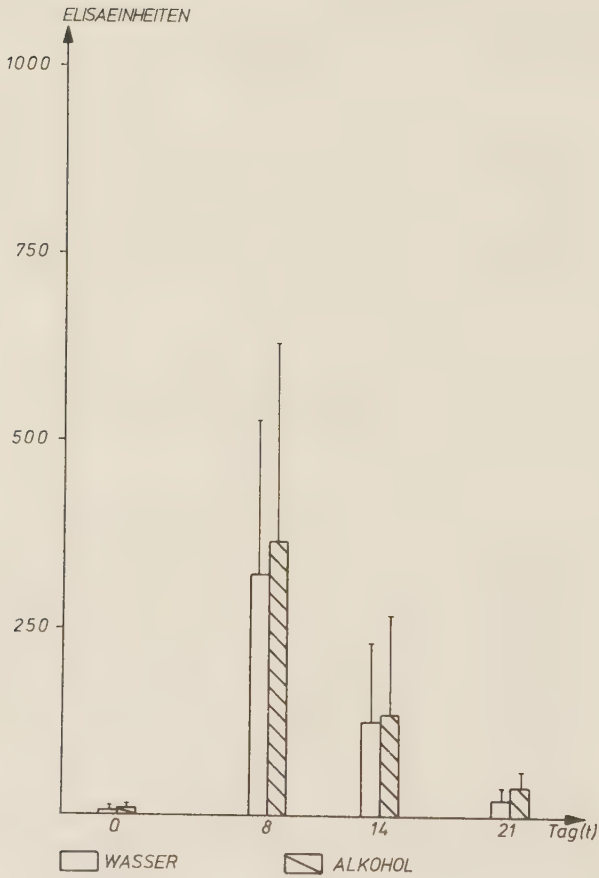


Abb. 7 Anti-HSA IgM-Konzentration von Kontrolltieren nach Injektion von HSA und oraler Verabreichung von Wasser bzw. Alkohol

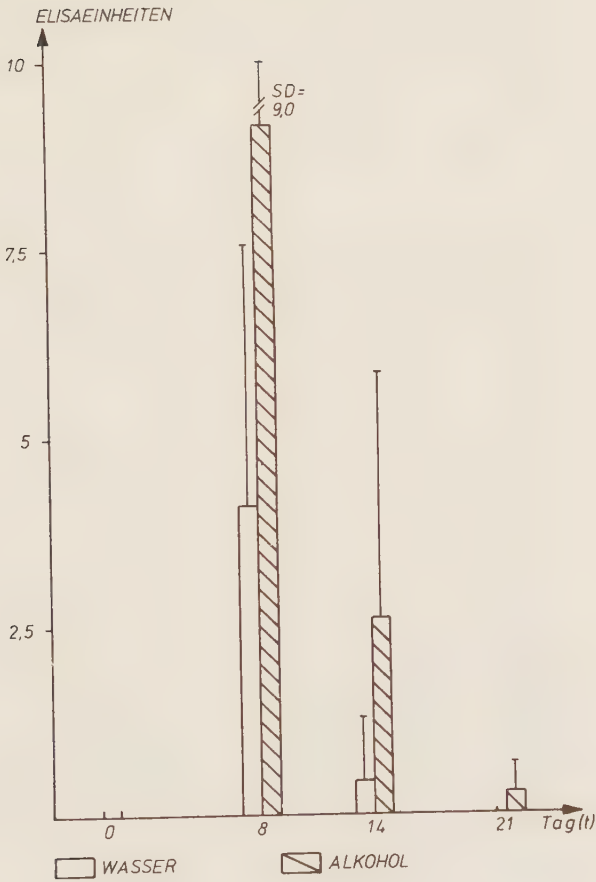


Abb. 8 Anti-HSA IgA-Konzentration von Kontrolltieren nach Injektion von HSA und oraler Verabreichung von Wasser bzw. Alkohol

IgA-Konzentrationen vorhanden sind. 21 Tage nach Beginn der Untersuchungen ist bei keinem Tier der Wassergruppe eine meßbare Menge an IgA-Antikörpern vorhanden, während noch ein Drittel der Tiere der Alkoholgruppe geringe Mengen derselben aufweist.

3.1.2. Dysgammaglobulinämische Tiere

3.1.2.1 Serum-IgG-Konzentration nach Injektion von HSA und oraler Verabreichung von Wasser (n = 7), Alkohol (n = 6), INFLUEX in alkoholischer Lösung (n = 6) und INFLUEX in wässriger Lösung (n = 6; Abb. 9)

Bis auf zwei Ausnahmen, bei denen keine meßbaren Ausgangswerte vorliegen, steigt bei allen Tieren bis zum 8.Tag nach der HSA-Verabreichung die Serum-IgG-Konzentration. Dabei liegen die Werte der mit INFLUEX in alkoholischer Lösung bzw. mit INFLUEX in wässriger Lösung behandelten Tiere etwa doppelt so hoch wie die der beiden anderen Gruppen. Bis zum Tag 21 bleibt der IgG-Spiegel der mit Wasser und Alkohol behandelten Gruppe etwa konstant, wobei die Alkoholgruppe unter der Wassergruppe liegt. Die IgG-Serumkonzentration der beiden INFLUEXgruppen sinkt langsam bis zum Tag 21 ab, wobei am Tag 14 beide Gruppen noch über den mit Wasser behandelten Tieren liegen, während 3 Wochen nach der HSA-Injektion nur noch die mit INFLUEX in alkoholischer Lösung behan-

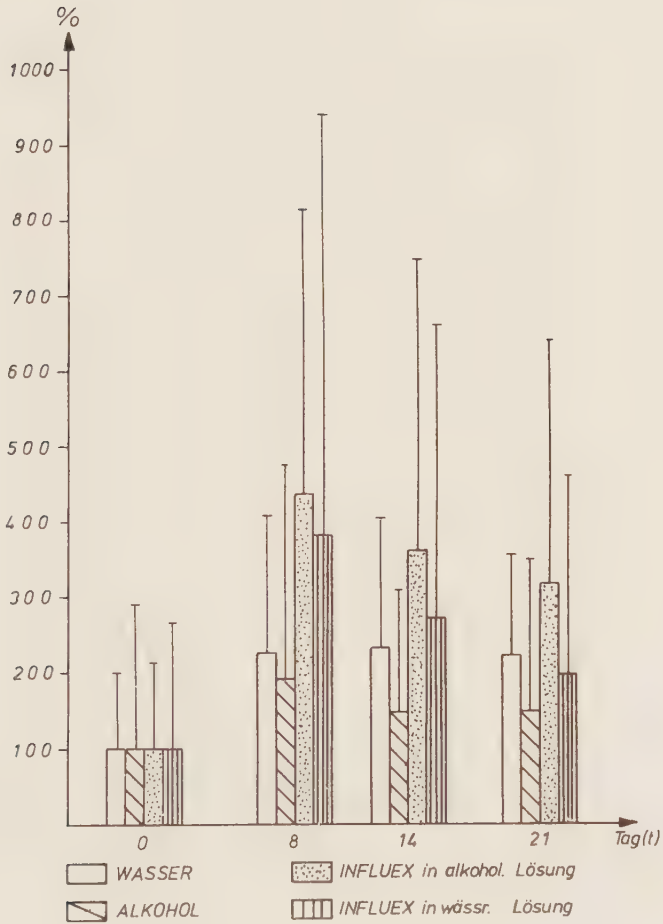


Abb. 9 Serum-IgG-Konzentration von dysgammaglobulinämischen Tieren nach Injektion von HSA und oraler Verabreichung von Wasser, Alkohol, INFLUEX in alkoholischer Lösung und INFLUEX in wässriger Lösung

delten Tiere einen höheren Wert als die Wassergruppe zeigen.

- 3.1.2.2. Serum-IgM-Konzentration nach Injektion von HSA und oraler Verabreichung von Wasser (n = 7), Alkohol (n = 6), INFLUEX in alkoholischer Lösung (n = 6) und INFLUEX in wässriger Lösung (n = 6; Abb. 10)

Acht Tage nach der Injektion von HSA und der oralen Behandlung mit den Prüfsubstanzen ist bei allen Gruppen eine Erhöhung der Serum-IgM-Konzentration zu verzeichnen, wobei die Werte aller Gruppen dicht beieinander liegen. Nach weiteren sechs Tagen steigen bis auf die mit INFLUEX in wässriger Lösung behandelte Gruppe die IgM-Spiegel noch etwas an und fallen dann mit Ausnahme der mit INFLUEX in alkoholischer Lösung behandelten Gruppe, die ein kontinuierliches Ansteigen der Serum-IgM-Konzentration zeigt, bis zum Tag 21 langsam wieder ab.

- 3.1.2.3. Serum-IgA-Konzentration nach Injektion von HSA und oraler Verabreichung von Wasser (n = 7), Alkohol (n = 6), INFLUEX in alkoholischer Lösung (n = 6) und INFLUEX in wässriger Lösung (n = 6; Abb. 11)

Mit Ausnahme der mit Alkohol behandelten antworteten alle Gruppen acht Tage nach Behandlung mit HSA und den Prüfsubstanzen mit einer leichten

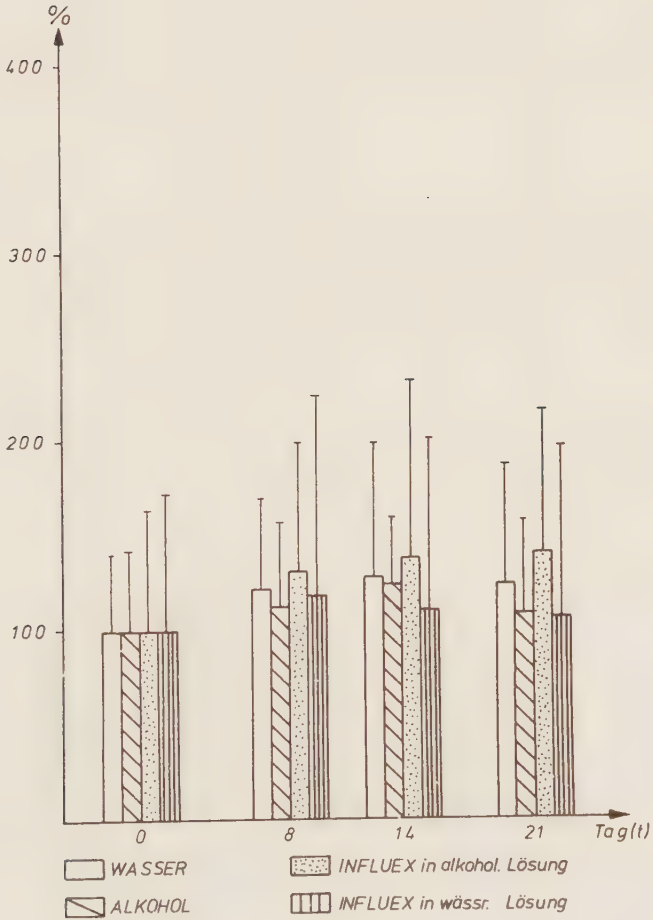


Abb. 10 Serum-IgM-Konzentration von dysgammaglobulinämischen Tieren nach Injektion von HSA und oraler Verabreichung von Wasser, Alkohol, INFLUEX in alkoholischer Lösung und INFLUEX in wässriger Lösung

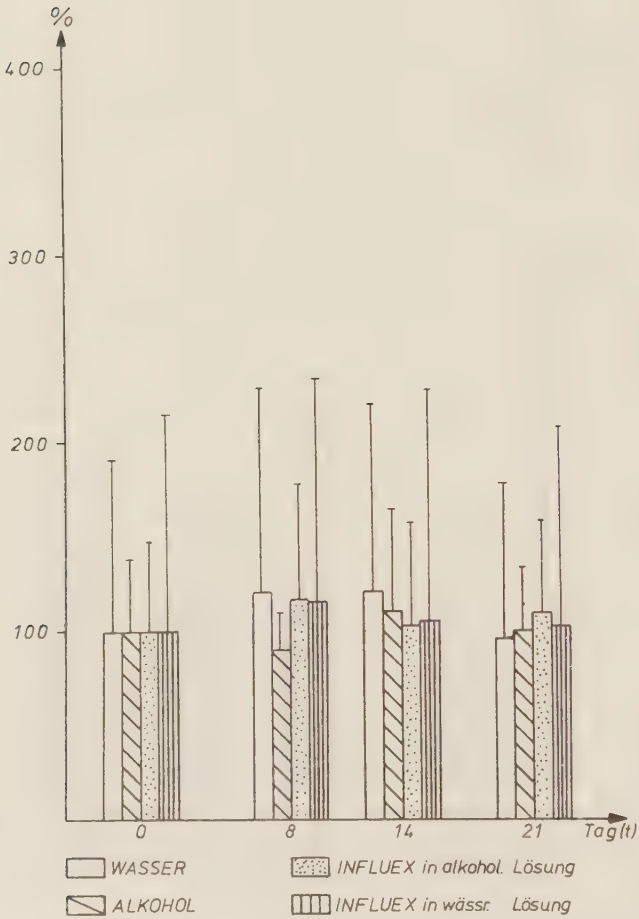


Abb. 11 Serum-IgA-Konzentration von dysgammaglobulinämischen Tieren nach Injektion von HSA und oraler Verabreichung von Wasser, Alkohol, INFLUEX in alkoholischer Lösung und INFLUEX in wässriger Lösung

Erhöhung der Serum-IgA-Immunglobuline. Zwei Wochen nach der Behandlung liegt nur noch die Wassergruppe deutlich über dem Ausgangswert, während eine Woche später die IgA- Serumkonzentrationen aller Gruppen etwa zum Ausgangspunkt zurückgefunden haben.

3.1.2.4. Anti-HSA IgG-Konzentration nach Injektion von HSA und oraler Verabreichung von Wasser (n = 7), Alkohol (n = 6), INFLUEX in alkoholischer Lösung (n = 6) und INFLUEX in wässriger Lösung (n = 6; Abb.12)

Vor dem Beginn der Untersuchungen weist von allen Gruppen nur ein einziges Tier eine geringe Menge von Anti-HSA IgG-Antikörpern auf. Bis zum Tag 8 nach der HSA-Injektion bilden alle Tiere der mit Alkohol und INFLUEX in alkoholischer Lösung behandelten Gruppen IgG-Antikörper, bei den anderen beiden Gruppen werden von einzelnen Tieren keine Antikörper gebildet. Dementsprechend ergeben sich bei den erstgenannten Gruppen wesentlich höhere Serum-IgG-Spiegel als bei den mit Wasser und mit INFLUEX in wässriger Lösung behandelten Gruppen. Dabei muß man sich vor Augen halten, daß diese hohen Werte größtenteils aus sehr hohen Einzelwerten resultieren, welche aber vom Serumimmunglobulingehalt unabhängig sind. Zum Tag 21 fallen die Anti-HSA IgG-Serumkonzentrationen bei allen Gruppen wieder ab, wobei die Verhältnisse zwischen den Gruppen wie am Tag 8 bleiben.

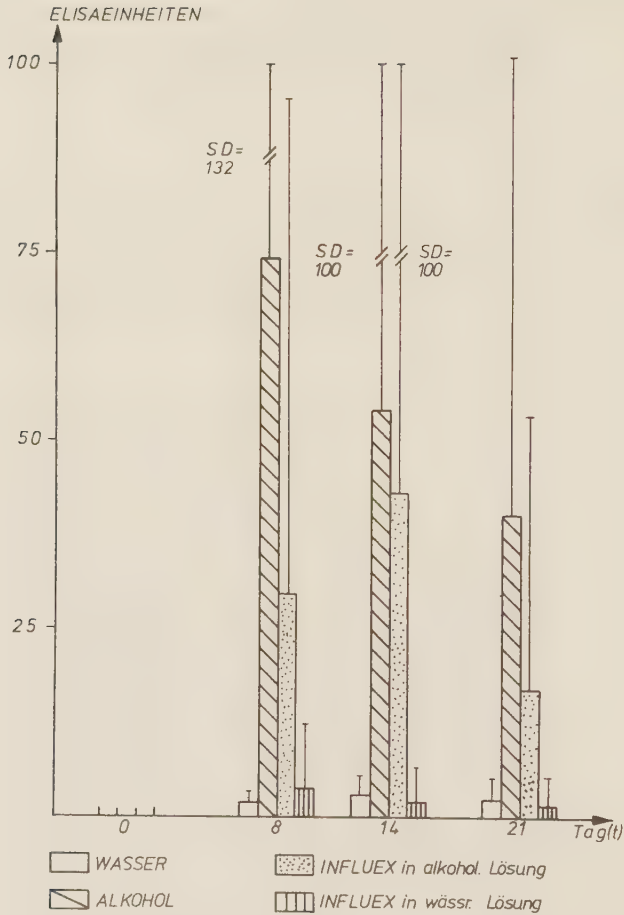


Abb. 12 Anti-HSA IgG-Konzentration von dysgammaglobulin-
ämischen Tieren nach Injektion von HSA und oraler
Verabreichung von Wasser, Alkohol, INFLUEX in al-

- 3.1.2.5. Anti-HSA IgM-Konzentration nach Injektion von HSA und oraler Verabreichung von Wasser (n = 7), Alkohol (n = 6), INFLUEX in alkoholischer Lösung (n = 6) und INFLUEX in wässriger Lösung (n = 6; Abb.13)

Alle Gruppen weisen vor Beginn der Untersuchungen geringe Mengen an Anti-HSA IgM auf. Bis zum Tag 8 nach der HSA-Injektion und der Verabfolgung der Prüfsubstanzen werden bei allen Gruppen die IgM-Antikörper im Serum erhöht, dabei erreicht die Alkoholgruppe nicht die Werte der anderen Gruppen, die etwa gleich groß sind. Am Tag 14 sind die Anti-HSA IgM-Konzentrationen aller Gruppen abgefallen; tendentiell liegen die Werte der Gruppe mit INFLUEX in alkoholischer Lösung wie auch schon am Tag 8 am höchsten. Sieben Tage später sinken die IgM-Antikörper bei allen Gruppen weiterhin ab, jetzt zeigt die Alkoholgruppe mit geringem Vorsprung die höchsten Werte.

- 3.1.2.6. Anti-HSA IgA-Konzentration nach Injektion von HSA und oraler Verabreichung von Wasser (n = 7), Alkohol (n = 6), INFLUEX in alkoholischer Lösung (n = 6) und INFLUEX in wässriger Lösung (n = 6; Abb.14)

Etwa die Hälfte aller Tiere zeigen vor der Injektion von HSA geringste Mengen an Anti-HSA IgA. Bis zum Tag 8 bilden alle Tiere Anti-HSA IgA-Antikörper, wobei die Durchschnittswerte der Gruppen mit Wasser bzw. INFLUEX in alkoholischer Lösung infolge hoher Einzeltierwerte am höchsten

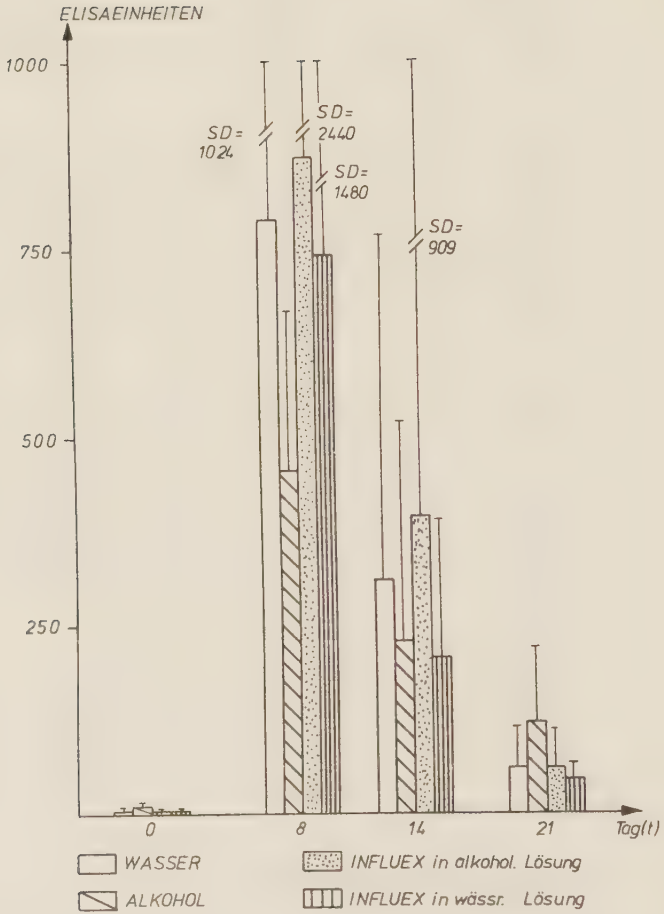


Abb. 13 Anti-HSA IgM-Konzentration von dysgammaglobulinämischen Tieren nach Injektion von HSA und oraler Verabreichung von Wasser, Alkohol, INFLUEX in alkoholischer Lösung und INFLUEX in wässriger Lösung

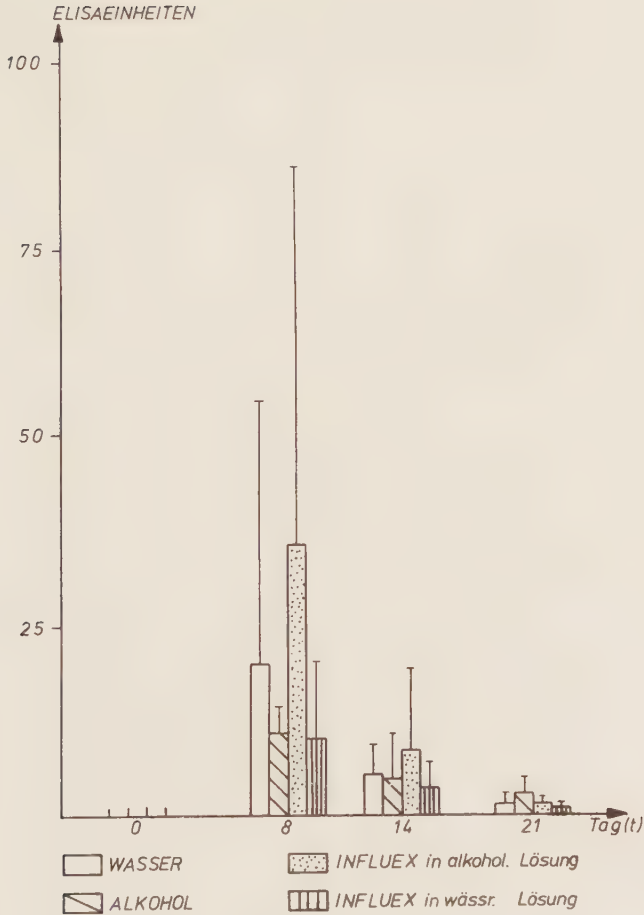


Abb. 14 Anti-HSA IgA-Konzentration von dysgammaglobulin-
ämischen Tieren nach Injektion von HSA und oraler
Verabreichung von Wasser, Alkohol, INFLUEX in al-
koholischer Lösung und INFLUEX in wässriger Lö-
sung

sind. Über den Tag 14 fallen die Werte bis zum Tag 21 kontinuierlich ab, wobei zwischen den einzelnen Gruppen keine großen Unterschiede mehr vorhanden sind.

3.1.3. Keimfreie Tiere

3.1.3.1. Serum-IgG-Konzentration nach Injektion von HSA und oraler Verabreichung von Wasser (n = 2) bzw. Alkohol (n = 5; Abb. 15)

Am Tag 5 nach der Behandlung mit HSA und den Prüfsubstanzen sind die Serum-IgG-Konzentrationen der Wassergruppe auf fast das Zweieinhalbfache, am Tag 8 auf fast das Achtfache der Ausgangskonzentration angestiegen, fallen dann bis zum 21. Tag wieder etwa auf das Dreifache der Ausgangskonzentration zurück. Die Serum-IgG-Spiegel der mit Alkohol behandelten Tiere zeigen einen ähnlichen Verlauf: Bis zum Tag 8 steigen sie auf knapp das Siebenfache der Ausgangswerte, um bis zum 21. Tag wieder auf den zweieinhalbfachen Ausgangswert abzusinken.

3.1.3.2. Serum-IgM-Konzentration nach Injektion von HSA und oraler Verabreichung von Wasser (n = 2) bzw. Alkohol (n = 5; Abb. 16)

Bis zum Tag 5 nach Prüfsubstanz und Alkoholbehandlung steigt der IgM-Spiegel der mit Wasser

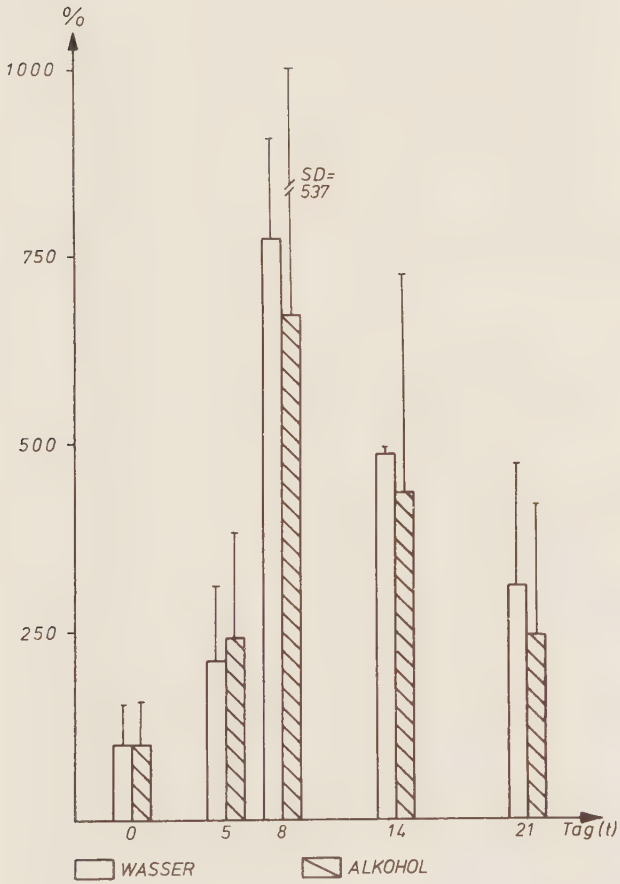


Abb. 15 Serum-IgG-Konzentration von keimfreien Tieren nach Injektion von HSA und oraler Verabreichung von Wasser bzw. Alkohol



Abb. 16 Serum-IgM-Konzentration von keimfreien Tieren nach Injektion von HSA und oraler Verabreichung von Wasser bzw. Alkohol

behandelten Tiere deutlich an, fällt zum Tag 8 auf einen Wert unterhalb der Ausgangslage zurück, um dann bis zum Tag 21 wieder kontinuierlich auf knapp das Doppelte des Ausgangswertes anzusteigen. Einen prinzipiell ähnlichen Verlauf zeigen die Serum-IgM-Konzentrationen der Alkoholgruppe: Nach einem deutlichen Anstieg am Tag 5 fallen die Werte bis zum Tag 8 auf etwa den Ausgangswert, um anschließend bis zum Tag 21 wieder auf den zweieinhalbfachen ursprünglichen IgM-Spiegel zu steigen.

3.1.3.3. Serum-IgA-Konzentration nach Injektion von HSA und oraler Verabreichung von Wasser (n = 2) bzw. Alkohol (n = 5; Abb. 17)

Alle Tiere der mit Wasser und HSA behandelten Gruppe zeigen meßbare IgA-Konzentrationen, während bei zwei der fünf mit Alkohol und HSA behandelten Tiere die IgA-Spiegel unterhalb der Meßgrenze liegen. Nach einem Anstieg um das Zweieinhalbfache bis zu Tag 5 fallen die IgA-Serumkonzentrationen der mit Wasser behandelten Tiere bis zu Tag 14 auf etwas über den ursprünglichen Wert ab, um dann bis zu Tag 21 wieder etwas anzusteigen. Die IgA-Werte der mit Alkohol behandelten Gruppe steigen bis zu Tag 8 auf über den zweieinhalbfachen Ursprungswert, um dann bis zum Tag 21 wieder zum Ausgangspunkt zurückzukehren.

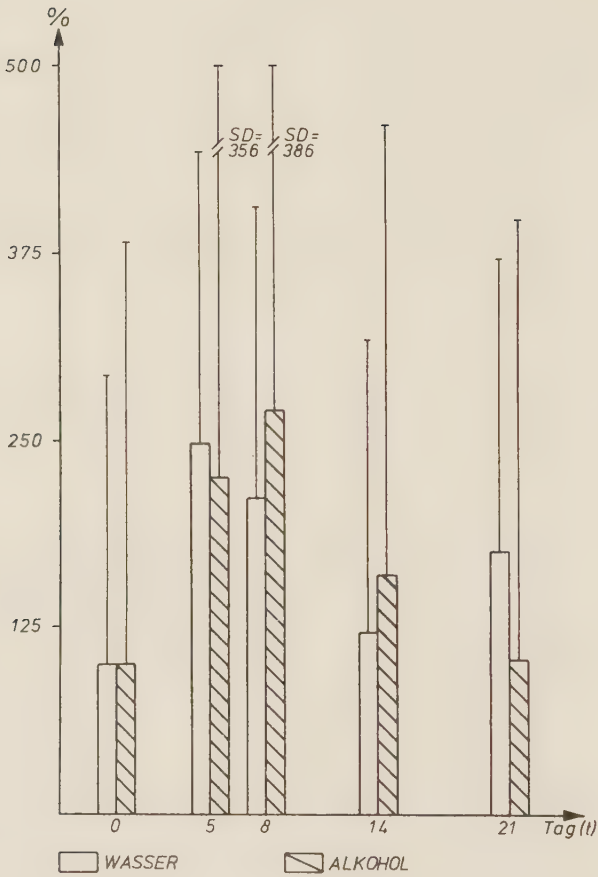


Abb. 17 Serum-IgA-Konzentration von keimfreien Tieren nach Injektion von HSA und oraler Verabreichung von Wasser bzw. Alkohol

3.1.3.4. Anti-HSA IgG-Konzentration nach Injektion von HSA und oraler Verabreichung von Wasser (n = 2) bzw. Alkohol (n= 5; Abb. 18)

Am Tag 0 sind bei keinem der Tiere meßbare Anti-HSA IgG-Konzentrationen vorhanden. Beide Gruppen zeigen bis zum Tag 5 nach der Behandlung mit HSA und den Prüfsubstanzen einen allmählichen Anstieg der Anti-HSA IgG-Spiegel, der dann bis zum Tag 8 stark ansteigt, um bis zum Tag 21 langsam wieder abzufallen. Die beiden Gruppen unterscheiden sich nur darin, daß die Antikörperkonzentrationen der mit Alkohol behandelten Tiere tendentiell etwas unter denen der wasserbehandelten Tiere liegen.

3.1.3.5. Anti-HSA IgM-Konzentration nach Injektion von HSA und oraler Verabreichung von Wasser (n = 2) bzw. Alkohol (n= 5; Abb. 19)

Bis auf zwei Ausnahmen in der Alkoholgruppe weisen alle Tiere bereits vor der Injektion mit HSA meßbare Anti-HSA IgM-Antikörper auf. Nach einem kräftigen Anstieg am Tag 5 fallen die IgM-Antikörper der mit Wasser behandelten Tiere bereits am Tag 8 wieder auf den Ausgangspunkt zurück, wo sie bis zum Tag 21 zu finden sind. Von den zwei Tieren dieser Gruppe sind bei einem Tier ab Tag 8 keine Anti-HSA IgM-Antikörper mehr nachweisbar, so daß ab diesem Zeitpunkt die Werte dieser Gruppe von einem einzigen Tier stammen. Die Serum-Anti-HSA IgM-Antikörper der mit Alkohol behandelten Tiere steigen bis zu Tag 5 steil auf etwa das Doppelte der Werte der Wassergruppe an, um bis zu Tag 14 wieder auf den Ausgangspunkt ab-



Abb. 18 Anti-HSA IgG-Konzentration von keimfreien Tieren nach Injektion von HSA und oraler Verabreichung von Wasser bzw. Alkohol

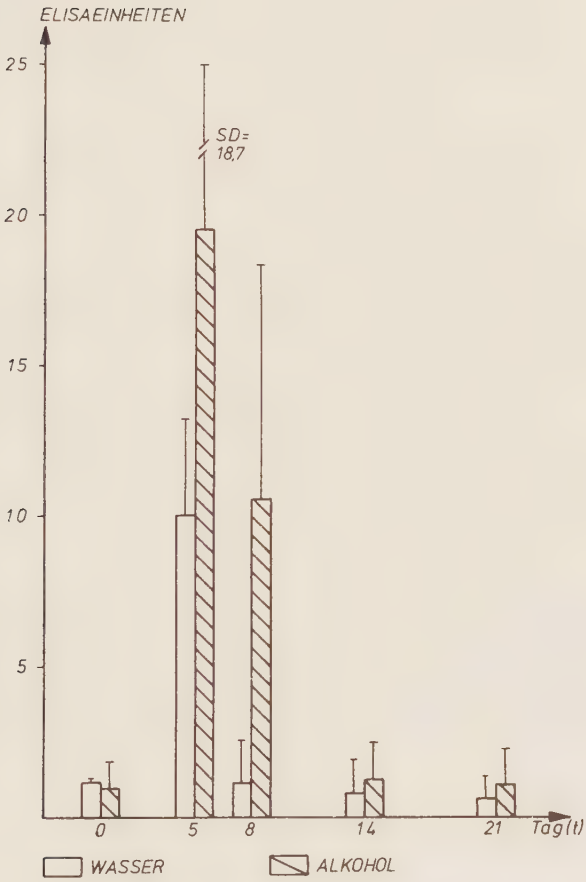


Abb. 19 Anti-HSA IgM-Konzentration von keimfreien Tieren nach Injektion von HSA und oraler Verabreichung von Wasser bzw. Alkohol

zusinken. der auch am 21. Tag noch zu messen ist. Bei den zwei der fünf Tiere dieser Gruppe, die am Tag 0 keine IgM-Antikörper aufweisen, sind bereits ab Tag 14 keine meßbaren IgM-Antikörper mehr vorhanden.

3.1.3.6. Anti-HSA IgA-Konzentration nach Injektion von HSA und oraler Verabreichung von Wasser (n = 2) bzw. Alkohol (n= 5; Abb. 20)

Bei keinem Tier der mit Wasser behandelten Gruppe sind vor der HSA-Injektion Anti-HSA IgA-Antikörper zu messen. An Tag 5 bilden beide Tiere geringe Mengen an spezifischen IgA-Antikörpern, während ab dem 8. Tag kein Tier mehr meßbares Anti-HSA IgA produziert. Der geringe Wert an spezifischen IgA-Antikörpern der Alkoholgruppe am Tag 0 stammt von einem einzigen Tier. Bis zum Tag 8 steigen die Antikörper kräftig an, wobei eines der beiden Tiere mit nicht meßbarem IgA-Serumspiegel (siehe unter 3.1.3.3.) gar keine und das andere nur am Tag 8 geringe Mengen an spezifischen IgA-Antikörpern produziert. Am 14. und am 21. Tag ist bei keinem Tier mehr ein meßbarer Anti-HSA IgA-Spiegel vorhanden.

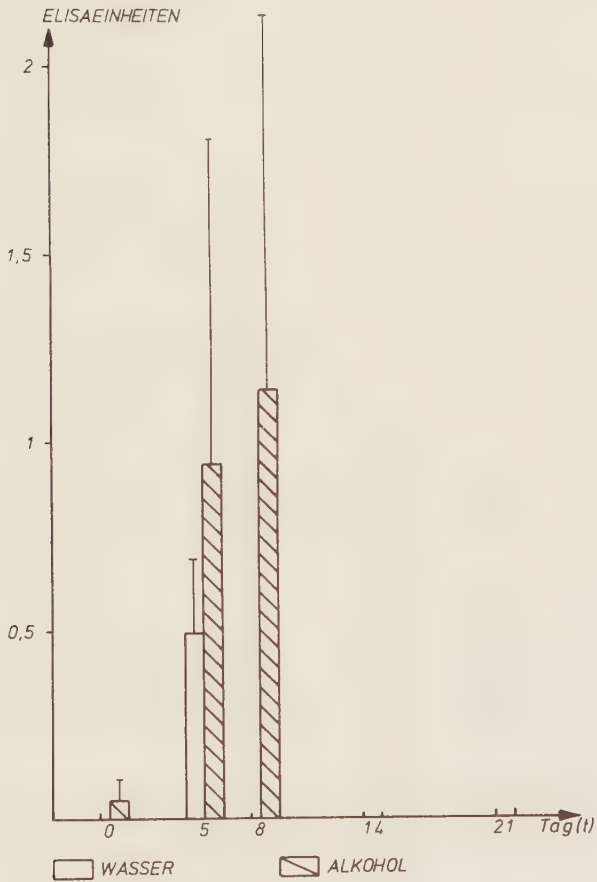


Abb. 20. Anti-HSA IgA-Konzentration von keimfreien Tieren nach Injektion von HSA und oraler Verabreichung von Wasser bzw. Alkohol

3.2. Carbon- Clearance- Test (Abb. 21)

- 3.2.1. Phagozytoseindices von Kontrollhühnern nach oraler Behandlung mit Wasser (n = 4), Alkohol (n = 4), INFLUEX in alkoholischer Lösung (n = 5) und INFLUEX in wässriger Lösung (n = 5)

Die mit Alkohol, INFLUEX in alkoholischer Lösung und INFLUEX in wässriger Lösung behandelten Tiere weisen deutlich höhere Phagozytoseindices auf als die mit Wasser behandelte Gruppe.

- 3.2.2. Phagozytoseindices von dysgammaglobulinämischen Hühnern nach oraler Behandlung mit Wasser (n = 4), Alkohol (n = 4) und INFLUEX in wässriger Lösung. (n = 4)

Gegenüber der Wasserkontrollgruppe sind die Phagozytoseindices der Alkoholgruppe leicht erhöht, während die Werte der mit INFLUEX in wässriger Lösung behandelten Gruppe unter dem Niveau der Kontrollgruppe liegt.

- 3.2.3. Phagozytoseindices von agammaglobulinämischen Hühnern nach oraler Behandlung mit Wasser (n = 2) bzw. Alkohol (n = 5)

Der durchschnittliche Phagozytoseindex der Alkoholgruppe liegt etwas über dem der Wassergruppe.

- 3.2.4. Phagozytoseindices der mit Wasser behandelten Kontrolltiere, dysgammaglobulinämischen Tiere und a-

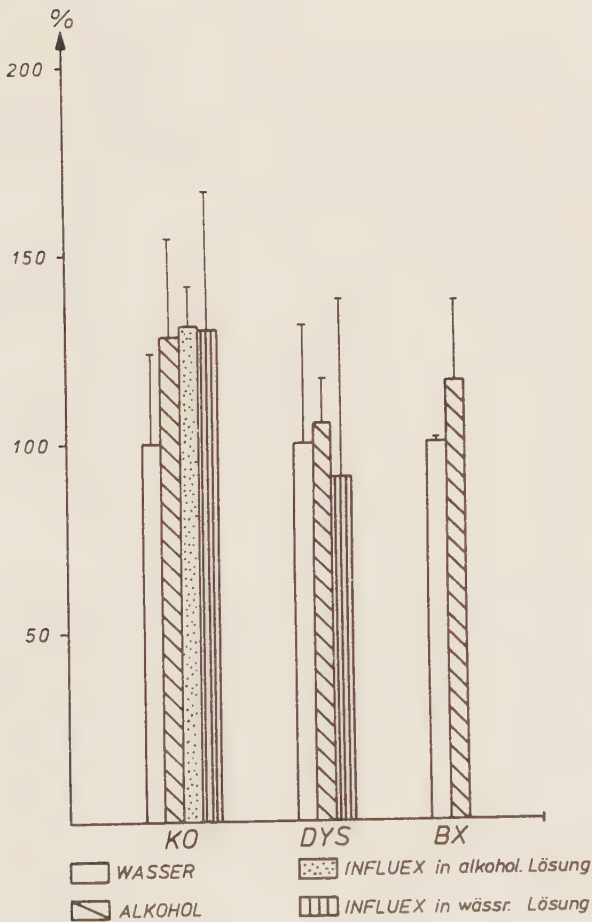


Abb. 21 Phagozytoseindizes von Kontrolltieren (KO), dysgammaglobulinämischen Tieren (DYS) und agammaglobulinämischen Tieren (BX) nach oraler Verabreichung von Wasser, Alkohol, INFLUEX in alkoholischer Lösung und INFLUEX in wässriger Lösung

gammaglobulinämischen Tiere im Vergleich(ohne Abb.)

Obwohl die einzelnen Tiergruppen aus den bei 2.10. angegebenen Gründen nur bedingt miteinander zu vergleichen sind, ist zu erkennen, daß die Phagozytoseindices größenordnungsmäßig auf demselben Niveau liegen.

4. DISKUSSION

4.1. Besprechung der Methoden

Ergebnisse von Untersuchungen der biologischen Wirkungen von Substanzen auf lebendige Organismen sind nur insoweit aussagekräftig, wie die verwendeten Untersuchungskriterien die zu erwartende Wirkung teilweise oder in ihrer Gesamtheit zu erfassen in der Lage sind. Bereits bei der Auswahl der zu verwendenden Untersuchungsmethoden trägt der Untersucher die Verantwortung, aus einem großen Arsenal von realisierbaren Möglichkeiten diejenigen auszuwählen, mit denen er die hinsichtlich der hypothetischen Wirkung am meisten relevanten Parameter gut reproduzierbar erfassen kann. Besonders bei Untersuchungen im Bereich des Körperabwehrsystems der höheren Vertebraten, wo die Aktionen der einzelnen Zellpopulationen und deren vielfältige Interaktionen noch nicht bis ins letzte Detail beleuchtet werden konnten, kann im Rahmen einer einzelnen Arbeit niemals das ganze Spektrum möglicher Einflüsse eines zu untersuchenden Wirkstoffes abgedeckt werden. Vielmehr wird durch ein punktuelles Abtasten einiger Funktionskreise des komplex aufgebauten Abwehrsystems versucht, wenigstens einen Teil der wirkstoffprovozierten Alterationen qualitativ oder quantitativ zu erfassen. Nicht zuletzt deshalb kommt der Auswahl und der Bewertung der Methoden größte Bedeutung zu, und weil nur durch eine genügende Anzahl und optimale Auswahl der untersuchten Parameter die Maschen im Netz der Untersuchung so klein gehalten werden können, daß sich ein möglicher Effekt des potentiellen Wirkstoffes nicht der Beobachtung entziehen kann und dadurch die Interpretationsfähigkeit der erhaltenen Ergebnisse gefährdet wird.

Die orale Verabreichung von Äthylalkohol führt, ausgehend von den Erkenntnissen beim Menschen, zu einer vollständigen und raschen Resorption in Magen und Darm und anschließend zur nahezu gleichmäßigen Verteilung im Körperwasser. Die Ausscheidung erfolgt zum allergrößten Teil durch die Metabolisierung in der Leber: Durch die Alkoholdehydrogenase (ADH), von deren Aktivität die Geschwindigkeit der Alkoholelimination fast ausschließlich abhängt, wird Äthanol zu Acetaldehyd oxidiert, welches durch weitere Oxidation in Essigsäure überführt wird, die zum kleineren Teil durch direkte Einschleusung in den Intermediärstoffwechsel dort verwertet werden kann, während der Hauptteil im Tricarbonsäurezyklus zu Wasser und Kohlendioxid aufgespalten wird. Von der Dosierung 0.1 ml einer 37 Vol%igen Lösung (=0.031 g Alkohol) pro kg Körpermasse darf erwartet werden, daß sie, wieder von den Verhältnissen beim Menschen ausgehend, in weniger als 15 Minuten zu einer höchstmöglichen Blutalkoholkonzentration von 0.005 % führt, welche dann innerhalb von 30 Minuten wieder auf den Nullwert absinkt (FORTH et al., 1980). Aus der skizzierten Pharmakokinetik des Äthanols wird ersichtlich, daß bei der für die Untersuchungen gewählten Dosis nur relativ kurzfristig geringen Quantitäten von Alkohol die Gelegenheit eingeräumt wird, auf die Zellen des Resistenz- und Immunsystems Einfluß nehmen zu können.

Ausschließlich spekulativ kann dagegen die Aufnahme und Verteilung der Inhaltstoffe von INFLUEX in den tierischen Organismus beurteilt werden, da auf der einen Seite die exakte Zusammensetzung der einzelnen pflanzlichen und tierischen Komponenten des Präparates unbekannt ist und auf der anderen Seite in der Literatur keine Hinweise auf die Pharmakokinetik der bekannten, pharmakologisch wirksamen, Inhaltstoffe nach oraler Applikation aufzufinden sind.

Manche Autoren sehen die Wirkungsweise der biologischen Arzneimittel hauptsächlich in einer synergistischen Kooperation der einzelnen Inhaltstoffe, deren Wirkungsprinzipien nach erfolgter biochemischer Isolierung infolge des Verlustes an gegenseitiger Potenzierung zum größten Teil erlöschen (TYMPNER, 1981). Die vom Amtlichen Homöopathischen Arzneibuch vorgeschriebenen speziellen Manipulationen (Schütteln, Verreiben) beim stufenweisen Verdünnen der Urtinkturen sollen durch Änderung des kolloidalen Zustandes und Modulierung anderer physikalischer Phänomene wie Katalyse, Affinität und Resonanz den therapeutischen Wert höherer Potenzen der einzelnen Wirkstoffe steigern (Informationsbroschüre der Deutschen Homöopathischen Union, Karlsruhe). In der Absicht, diesen erfahrungsmedizinischen Hypothesen Grenzen zu setzen, sollen im Folgenden nur die möglichen Resorptionsverhältnisse der drei eingangs erwähnten Echinaceainhaltstoffe mit bekanntem Wirkungsmuster diskutiert werden: Während für das kleine lipophile Molekül cis 1,8 Pentedecadien und das Echinacosid zumindest eine teilweise enterale Resorption in unveränderter Form erwartet werden darf, werden die beiden Echinacea-Polysaccharide das Schicksal eines jeden Polysaccharides im Magen-Darm-Trakt, nämlich entweder die enzymatische Aufspaltung zu Monosacchariden und anschließender Resorption in dieser Form oder die Ausscheidung per vias naturalis in unveränderter Form, erleiden, womit also nach oraler Verabreichung von INFLUEX ein partieller Wirkungsverlust zumindest nicht auszuschließen wäre.

Eine wichtige Rolle für den Grad der Wirksamkeit eines immunstimulierenden Arzneimittels spielt die Wahl des Verabreichungszeitpunktes ; denn nach übereinstimmender Meinung vieler Autoren ist der prophylaktische Wert dieser Pharmaka dem therapeutischen Wert weit überlegen, weshalb

der Hauptindikationsanspruch in protektiven Maßnahmen gegen drohende infektiöse Noxen zu suchen ist. Dem wurde in den Untersuchungen dadurch Rechnung getragen, daß die Prüfsubstanzen etwa 30 Minuten vor der Inkorporation des Antigens HSA bzw. 24 Stunden vor der Bestimmung der Phagozytoseaktivität appliziert wurden.

Mit der Rocket-Immunelektrophorese wurde die jeweilige Gesamtheit der drei Immunglobulinisotypen des Huhnes im Serum vor der Immunisierung mit Humanserumalbumin bestimmt und bis drei Wochen danach verfolgt. Mit dieser Methode werden alle Antikörper, welche das isotypspezifische Fc-Stück der jeweiligen Immunglobulinklasse tragen unabhängig von der Antigenspezifität erfaßt, womit in die Ergebnisse dieser Methode die Gesamtheit der humoralen Immunantworten des untersuchten Individuums im untersuchten Zeitraum einfließen, unabhängig davon, ob sie das Resultat der kontrollierten Antigenprovokation durch das HSA oder die Konsequenz zufällig erfolgter Umweltinfektionen sind. Demzufolge darf aus einem im Untersuchungszeitraum stark ansteigenden individuellen Serumimmunglobulinspiegel nicht zwangsläufig auf eine überdurchschnittlich potente bzw. durch eine Stimulation potenzierte humorale Immunantwort geschlossen werden. Nichtsdestoweniger wurden durch das Unterbringen der Tiere in keimarmen Umgebung unter möglichst konstanten klimatischen Bedingungen (SPF- Stalungen) bzw. im keimfreien Milieu (Isolator) gezielt derartige Störfaktoren hintangehalten.

Die Quantifizierung der spezifisch gegen das Immunisierungsantigen HSA gerichteten Antikörperklassen erfolgte mit dem Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Es soll an dieser Stelle begründet werden, weshalb der Extinktionswert von 0.1 als cut-off Wert, das heißt als

Wert, bei dem Probe und Standard verglichen werden, herangenommen wird.

Wie bei ALTMANN (1984) bzw. CAULFIELD und SHAFFER (1984) beschrieben, weisen Anti-HSA Antikörper verschiedene Affinitäten zum Antigen HSA auf. Demzufolge können zwei Serumproben, die den gleichen Gehalt an Anti-HSA Antikörpern besitzen, deren Antikörper aber eine unterschiedliche Affinität zum Antigen HSA haben, auf der ELISA-Platte bei derselben Verdünnungsstufe unterschiedlich hohe Extinktionswerte aufweisen. Dieser Extinktionsunterschied zweier solcher Seren ist bei niederen Verdünnungsstufen sehr groß und sinkt bei zunehmender Verdünnung, da durch die kleiner werdenden Gehalte an Antikörpern zwar der relative Unterschied zwischen schwach affinen und stark affinen Antikörpern konstant bleibt, der absolute Unterschied aber, der gemessen wird, abnimmt. Man muß zum Vergleich zweier Proben, bei denen man die Affinität der Antikörper zum Antigen nicht kennt, einen Extinktionswert heranziehen, bei dem einerseits diese Affinitätsunterschiede eine geringe Rolle spielen und andererseits noch ein ausreichender Abstand zu unspezifischen Hintergrundbindungen gewahrt bleibt. PETERFY et al. (1983) schlugen deshalb einen Wert vor, der 10% der maximalen Extinktion beträgt (was bei dem von uns benutzten Photometer, dessen obere Anzeigegrenze 2 beträgt, einer optischen Dichte von 0,2 entspräche). Dieser Wert erscheint angesichts eines sehr niedrigen Backgrounds etwas hoch, so daß in vorliegender Arbeit der von CAULFIELD und SHAFFER (1984) benutzte cut-off Wert von 0.1 zum Vergleich zwischen Probe und Standard herangezogen wurde. Da die Ungenauigkeit beim Herstellen der logarithmischen Verdünnungsreihe durch die Verwendung eines Multi-Pipettiergerätes (Fa. Dynatech) anstatt des Takatsy-Mikrotitrators wesentlich herabgesetzt werden konnte

(Überprüfung durch Herstellung einer Farbstoffverdünnungsreihe) und durch verfeinerte Methoden beim Waschen der ELISA-Platten die unspezifische Hintergrundsbindung auf praktisch Null reduziert wurde, verliert die Argumentation, daß durch die Ungenauigkeit beim Verdünnen eine Interpolation zwischen zwei Verdünnungsstufen sinnlos sei, ihre Bedeutung (ALTMANN, 1984).

Die Resultate dieses Testes sind im beobachteten Zeitraum ein Maß für die Leistungsfähigkeit des B-Zell-Systems und der Kooperation der diversen T-Zellpopulationen untereinander und mit den B-Lymphozyten. Durch die ausschließliche Abhängigkeit von der kontrollierten Antigenverabreichung sind die Konzentrationen dieser spezifischen Antikörper, sieht man von der Möglichkeit eines bezüglich der Antikörperproduktion synergistischen Zusammenspiels mit einer Zufallsinfektion ab (ROLLE et al., 1978), repräsentativer für den immunologischen Status des Beobachtungszeitraumes als die quantitative Erfassung der Gesamtimmunglobuline.

Der Carbon-Clearance Test ist eine bewährte, relativ einfach handzuhabende Methode zur Einschätzung des Leistungsniveaus des Retikuloendothelialen Systems (RES), insbesondere der phagozytierenden Zellen der Leber und der Milz: Nach intravenöser Inkorporation kolloidal gelöster Kohlepartikel werden bei der Maus 90% der Teilchen in der Leber und 4% in der Milz wiederentdeckt (BIER et al., 1979). BIOZZI et al. (1953) fanden bei Ratten erst ab einer Dosierung von 320 mg Kohle pro kg Körpermasse phagozytierte Kohleteilchen zusätzlich in der Lunge, während GLICK et al. (1964), die den Carbon-Clearance Test bei einer variablen Kohledosierung von ca. 40 - 430 mg / kg Körpermasse beim Huhn durchführten, bei der Autopsie der

Versuchshühner eine Stunde nach der Kohleinjektion die Leber, die Milz, das Knochenmark und die Nebennieren stark, die Nieren sowie die Lunge nur geringfügig gefärbt vorfinden und zu diesem Zeitpunkt im Blut keine Kohlepartikel mehr nachweisen konnten. Zu den peripheren, mobilen, phagozytierenden Zellen im Blut gehören beim Huhn neben den Monozyten und den heterophilen, eosinophilen und basophilen Granulozyten auch die sich durch eine intensive Phagozytoseleistung auszeichnenden Thrombozyten (GLICK et al., 1964; STERZ und WEISS, 1974; CHANG et al., 1979) und die Erythrozyten (PRUNESCO, P. und PRUNESCO, C., 1972). Von diesen Zelltypen zeigen sich neben den Monozyten vor allem die Thrombozyten für eine massive Inkorporation von Kohlepartikeln nach intravenöser Tuschezufuhr verantwortlich, während bei heterophilen Granulozyten keine einverleibten Kohleteilchen nachzuweisen sind. (AWADIYA et al., 1980). Durch ihre Anwesenheit im Blut innerhalb des Zeitraumes der Durchführung des Testes (bis 9 Minuten nach der Kohleapplikation) wird mit der Carbon-Clearance-Methode die Leistung der mobilen Blutphagozyten aber nicht berücksichtigt, so daß die erhaltenen Ergebnisse nur für die Phagozytoseaktivität der sessilen Makrophagen repräsentativ sind.

Bei der Identifizierung von Partikeln, die es zu phagozytieren gilt, bedienen sich die Makrophagen zweierlei Mechanismen: Neben der Immunphagozytose, die ihren Namen der Opsonierung des Fremdpartikels durch Serumproteine, insbesondere durch die Komplementkomponente C 3b und durch das Immunglobulin G vor der Aufnahme in den mit dem entsprechenden Fc- bzw. C 3b-Rezeptor ausgestatteten Makrophagen verdankt, existiert ein zweiter, nicht immunologischer Erkennungsmechanismus, durch den in erster Linie chemisch innerte Substanzen wie Asbestfasern, Silica oder auch Kohlepartikel identifiziert werden (Abb. 22). Das Prinzip

einer derartigen Interaktion zwischen Phagozyt und Partikel beruht vermutlich auf elektrostatischen und hydrophilen Bindungskräften zwischen der Makrophagenoberfläche und der Fremdschubstanz (MAYER, 1984).

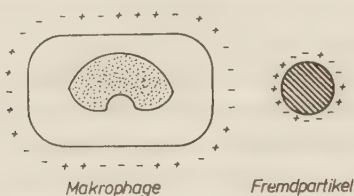


Abb. 22 Erkennungsprinzip zwischen Makrophage und Kohleteilchen (nach MAYER, 1984)

Demzufolge stellt die bilaterale physikalische Attraktion zwischen dem sessilen Makrophagen einerseits und dem Kohleteilchen andererseits das beim Carbon-Clearance Test gültige Erkennungsprinzip dar, worauf begründet eine Unabhängigkeit zwischen dem nach diesem Meßsystem erhaltenen Phagozytoseindex und der IgG-Serumkonzentration des Individuums erwartet werden kann.

Für die Aussagekraft der beim Carbon-Clearance-Test erhaltenen Ergebnisse ist eine exakte Dosierung der verabreichten Kohle ausschlaggebend. BIOZZI et al. (1953) stellten fest, daß der Phagozytoseindex in einem reziproken Verhältnis zur gewählten KohleKonzentration steht, was bedeutet, daß die Phagozytoseaktivität mehrerer Tiere nur bei konstanter Kohledosis verglichen werden darf. Um im Versuch eine möglichst konstante Kohledosis zu realisie-

ren, wurde die Tusche mit einer (zusätzlich kolloidstabilisierenden) Gelatinelösung verdünnt, wodurch ein (beim Huhn nie ganz vermeidbares) subkutanen Installieren einer kleinen Menge der Injektionslösung beim Herausziehen der Kanüle eine wesentlich geringere Fehlerquote verursacht.

Die Verwendung schellackhaltiger Tusche führt bei der Ratte nach BIOZZI et al.(1953) ab einer Dosis von 160 mg/kg Körpermasse durch eine schellackindizierte Thromboplastinfreisetzung zur intravasalen Fibringerinnung, als deren Folge Kohlekonglomerate entstehen, welche durch Embolien von Lungenkapillaren zu Todesfällen führen können. Da schellackfreie Tusche derzeit nicht zur Verfügung steht, wurde, um derartige Todesfälle zu vermeiden, für die Untersuchungen eine Kohlekonzentration von 80 mg / kg Körpermasse gewählt, welche andererseits noch dazu ausreicht, durch genügend hohe Extinktionswerte die Abnahme der Kohlekonzentration im Blut photometrisch über mehrere Minuten verfolgen zu können.

Aufgrund großer Streuungen der Phagozytoseindices von gleichbehandelten Tieren führten BIOZZI et al. (1953) den sogenannten korrigierten Phagozytoseindex ein, in dessen Berechnung außer dem unter 2. 10. beschriebenen eigentlichen Phagozytoseindex noch der Quotient aus dem Gewicht des Versuchstiereseinerseits und der nach der Testdurchführung gewonnenen Organe Leber und Milz andererseits einfließt. Der so erhaltene korrigierte Phagozytoseindex soll wesentlich geringere individuelle Schwankungen aufweisen; er wurde aber im Rahmen der Untersuchungen zu dieser Arbeit nicht berücksichtigt, da das wertvolle Tiermaterial nach den Untersuchungen nicht der Tötung zugeführt werden konnte. Von Interesse ist, daß die korrigierten Phagozytoseindices bei verschiedenen Tierspezies relativ konstante Werte ergeben, während die eigentlichen

Phagozytoseindices größeren speziesbezogenen Variationen unterworfen sind (BIER et al., 1979), was noch einmal die hervorragende Bedeutung der hepatosplenischen Makrophagen bei der Elimination der Kohlepartikel aus dem Blut unterstreicht.

Durch die beschriebenen Methoden wird ein weites Spektrum an Möglichkeiten der in vivo-Einflußnahme der Prüfsubstanzen auf die körpereigene Abwehr abgetastet und (gemeinsam mit den bisher unveröffentlichten Untersuchungen im Hause) zum ersten Mal durch direktes Messen der Serumimmunglobuline und antigenspezifischen Antikörper eine Stimulierung der humoralen Immunität durch ein Echinacea-haltiges Präparat nachzuweisen versucht. Daneben stellen letztere Methoden die einzige Möglichkeit dar, das von der Norm abweichende Verhalten der UM - Bl9 Hühnerlinie in ihrer vollen Breite zu erfassen und somit dieses Hühnermodell optimal auszunutzen.

4.2. Besprechung der Ergebnisse

Der Alkoholeffekt bestand bei Kontrolltieren und keimfrei gehaltenen Tieren aus einer erhöhten Bildung von immunisierungsantigenspezifischen Antikörpern der Klasse IgA bzw. bei den immundefizienten dysgammaglobulinämischen UM-Bl9 Hühnern aus einer vermehrten IgG-Antikörperproduktion, wobei letztere Hühner jedoch weniger IgM-Antikörper produzierten als eine wasserbehandelte Kontrollgruppe. Bei Kontrollhühnern, dysgammaglobulinämischen Hühnern und bei agammaglobulinämischen (hormonell bursektomierten) Hühnern konnte durch Äthanol eine geringe Steigerung der Phagozytoseaktivität gezeigt werden.

Bei den dysgammaglobulinämischen Hühnern (Abb. 9) konnte

eine durch den Einfluß von INFLUEX sowohl in alkoholischer als auch in entalkoholisierter Lösung bedingte gesteigerte Bildung von Immunglobulin G beobachtet werden. Nach der Verabreichung von INFLUEX konnte bei den Kontrollhühnern eine Phagozytosestimulierung festgestellt werden (Abb. 21), während die dysgammaglobulinämischen Tiere mit einer minimalen Phagozytosesuppression reagierten.

Auf die Frage, ob das alte Sprichwort "Wenn's dich friert, ist ein Kognägchen besser als gar kein Jäckchen" einen ernstesten Hintergrund besitzt oder ob es nur den Wunschvorstellungen mancher Genießer entspricht, das heißt, ob eine einmalige Verabreichung einer kleinen Menge Alkohol die Körperabwehrkräfte anzuregen vermag sollte im Rahmen dieser Arbeit eine Antwort zu finden versucht werden.

Bei den alkoholbehandelten dysgammaglobulinämischen UM-B19 Hühnern war im Vergleich zur wasserbehandelten Kontrollgruppe ein schwächeres Ansteigen und während des ganzen Beobachtungszeitraumes eine weniger hohe Serum-IgG-Konzentration (Abb. 9; Angabe in Prozent des Ausgangswertes!) zu verzeichnen, während dieselbe Tiergruppe auf die HSA-Immunisierung mit einem wesentlich höheren Durchschnittswert an spezifischen HSA-Antikörpern dieser Klasse antwortete (Abb. 12), der allerdings durch einen extrem hohen Einzelwert bedingt und deshalb statistisch nicht signifikant ist. Für dieses zunächst paradox erscheinende Verhalten läßt sich jedoch, beleuchtet man die absoluten Zahlenverhältnisse im Bereich der IgG-Serumkonzentrationen etwas genauer, eine einfache Erklärung finden: Vor Untersuchungsbeginn wies die später mit Alkohol behandelte Gruppe, wohl durch vorangegangene Konfrontation mit einem stark immunogenen Agens (siehe 4.1.), im Vergleich zu den anderen dysgammaglobulinämischen Gruppen etwas höhere

Serumimmunglobulinkonzentrationen, insbesondere einen etwa zehnmal höheren IgG-Gehalt auf, so daß bei der gewählten Angabe der Immunglobulinkonzentration in Prozent des Ausgangswertes trotz einer in absoluten Werten über der Kontrollgruppe liegenden Zunahme eine in diesem Fall etwas irreführende schwache Steigerung erhalten wird. Es ist kein Zusammenhang zwischen individuellen Serum-IgG-Spiegeln und der Produktion von Antikörpern dieser Klasse festzustellen, womit die erhöhte Antikörperproduktion nicht ohne weiteres durch ein "Training" des B_G-Zellpools durch eine oben diskutierte Umwelt-infektion erklärbar ist. Vielmehr sollte, von der Beobachtung ausgehend, daß nahezu jedes alkoholbehandelte Tier mehr IgG-Antikörper produziert als das wasserbehandelte Tier mit der höchsten Anti-HSA IgG-Bildung, ein Alkoholeinfluß auf das Immunsystem für die doch beachtliche IgG-spezifische Antikörperproduktion in Betracht gezogen werden. Von LUNDY et al. (1975) sowie von ATKINSON et al. (1977) konnte durch in vitro Versuche gezeigt werden, daß Äthylalkohol entweder in hoher Konzentration oder durch lange Einwirkungsdauer die Proliferation von T-Lymphozyten zu hemmen in der Lage ist, während B-Lymphozyten sich einer Alkoholeinwirkung gegenüber unbeeinflußt verhielten. Zwei Möglichkeiten einer direkten alkoholinduzierten Beeinflussung des die B-Zell-vermittelte humorale Immunantwort kontrollierenden T-Zellsystem stehen zur Diskussion: Entweder vermögen schon geringste Alkoholkonzentrationen ein "hypersensibles" IgG-spezifisches T-Suppressorzellsystem zu unterdrücken oder die Alkoholwirkung wird, da selbst die höchstmögliche Alkoholblutkonzentration noch deutlich unter dem sogenannten biphasischen Punkt liegt, ins Gegenteil verkehrt, wonach an eine alkoholverursachte Stimulation von T-Helferzellen zu denken wäre. Voraussetzung dafür wäre allerdings ebenso ein extrem empfind-

liches IgG-spezifisches T-Helfersystem bei den dysgamma-globulinämischen Hühnern, da nur bei diesem Immunglobulinisotyp dieser Hühnerlinie nach Alkoholverabreichung ein entsprechend deutlicher Zuwachs festgestellt werden konnte.

Offen bleiben wird auch die endgültige Antwort auf die Frage, worauf die wesentlich unter dem Durchschnitt der Kontrollgruppe liegende Zunahme an antigenspezifischen IgM-Antikörpern der alkoholbehandelten dysgammaglobulinämischen Hühner zurückzuführen ist. Möglicherweise wurde ein adäquates Ansteigen der IgM-Antikörper durch einen negativen feed-back Mechanismus der bei dieser Gruppe doch in beachtlichem Maß vorhandenen IgG-Antikörper kupiert, wofür eindeutig die Einzeltierverläufe dieser Gruppe sprechen: Bei allen Tieren besteht ein deutlicher Zusammenhang zwischen hohen Konzentrationen an IgG- und niederen Konzentrationen an IgM-Antikörpern. Alternativ könnte eine wie für die B_G-Zellen postulierte hochempfindliche IgM-spezifische T-Helferpopulation für die wenig hohen IgM-Antikörperkonzentrationen verantwortlich gemacht werden; dagegen spricht nicht die Feststellung, daß bei den mit INFLUEX in alkoholischer Lösung behandelten Tieren keine adäquate Depression zutage tritt, denn nach ATKINSON et al. (1977) hemmt Alkohol nur in den höchsten der in ihren Versuchen verwendeten Konzentrationen die Transformation mitogenstimulierter T-Lymphozyten, wonach die INFLUEX-Inhaltstoffe, eine mitogene Wirkung vorausgesetzt (siehe unten), eine protektive Wirkung gegen den Äthanol einfluß entwickeln könnten.

Die bei den alkoholbehandelten, nicht immundefizienten Hühnerlinien (Kontrollhühner, keimfreie Hühner) erhöhten Spiegel an antigenspezifischen IgA-Antikörpern, welche bei

diesen Tieren im Serum die mengenmäßig am schwächsten vertretene Isotypenklasse darstellt, erlauben in Erinnerung an die alkoholbedingten Alterationen der IgG-Antikörperkonzentrationsverhältnisse bei den dysgammaglobulinämischen Hühnern, die dort die am geringsten repräsentierte Antikörperklasse ausmacht, die Vermutung, daß für den Äthylalkoholeinfluß besonders die für eine Homöostase des Verhältnisses der Immunglobulinisotypen untereinander verantwortlichen Regulationssysteme empfindlich sind, wobei der Effekt des Äthanols zu einer Überrepräsentation der üblicherweise im Serum nur in geringer Konzentration vorliegenden Immunglobulinisotypen führt. Wenn man als humorale immunologische Potenz die Summe der gebildeten antigenspezifischen Antikörper versteht, darf aufgrund der erhaltenen Ergebnisse der Alkohol in der gewählten Dosis keinesfalls als Immunstimulans bezeichnet werden, da der Zuwachs einer Antikörperklasse angesichts der absoluten Zahlenverhältnisse entweder in den Hintergrund tritt (IgA bei Kontroll- und keimfrei gehaltenen Hühnern) oder sogar durch eine gemäßigte Bildung einer anderen Klasse total kupiert wird (IgG bei den dysgammaglobulinämischen Hühnern).

Die deutlichste Alkoholwirkung bei diesen Untersuchungen zeigt die bei allen Hühnerlinien festgestellte Phagozytostimulation, die in guter Übereinstimmung mit Ergebnissen beim Menschen steht, wo durch eine einmalige Verabfolgung eines geringen Alkoholquantums ebenfalls eine in vivo Stimulation der seßhaften Makrophagen gefunden wurde (HÄNSEL, 1981); zu Resultaten mit einer ähnlichen Aussage kamen auch HALLENGREN und FORSGEN (1978), die bei in vitro Untersuchungen mit Granulozyten einen phagozytostesteigernden Effekt geringer Alkoholkonzentrationen im Medium beobachten konnten. Ein interessantes Nebenergebnis

stellt die Beobachtung dar, daß die wasserbehandelten Tiere aller Hühnerlinien ähnlich große Phagozytoseindices zeigten, was die Unabhängigkeit der nicht immunologischen Phagozytose von den opsonierenden Serumbestandteilen, in diesem Fall von den Immunglobulinen, demonstriert. Dieses Resultat knüpft an die Beobachtungen von GLICK et al. (1964) an, die zwischen bursektomierten Hühnern und Kontrolltieren durch Untersuchungen mit dem Carbon-Clearance-Test ebenfalls keine Unterschiede bezüglich der Leistungsfähigkeit der hepatosplenischen Makrophagen verbuchen konnten. Außerdem soll an dieser Stelle noch angemerkt werden, daß der bei diesen Untersuchungen erhaltene durchschnittliche Phagozytoseindex der (wasserbehandelten) Kontrollgruppen wesentlich höher als die Phagozytoseindices liegt, die bei gleicher Kohlekonzentration bei den Spezies Maus, Ratte und Kaninchen gemessen wurden (BIER et al., 1979).

Die biochemischen bzw. biophysikalischen Grundlagen der Äthanolwirkung auf die tierische Zelle ist inzwischen weitgehend geklärt. Chemische Alkoholeffekte sind nur in der Leber zu verzeichnen, wo der Alkohol und seine Metaboliten bei chronischer Zufuhr zu einem toxisch wirkendem, erhöhten $\text{NADH} / \text{NAD}^+$ Verhältnis führen, was aber für die vorliegende Arbeit uninteressant ist, da STACEY (1984) zeigen konnte, daß der Alkohol selber und nicht sein wichtigster Metabolit Acetaldehyd das wirksame Agens bei der Einflußnahme auf die Zellen des körpereigenen Abwehrsystems darstellt. Da keine äthanolspezifischen Rezeptoren gefunden werden konnten und der Alkohol ausschließlich in der Leber verstoffwechselt wird, nimmt man ein für alle Zellen des Organismus gültiges, physikalisches Wirkprinzip an, welches auf Alterationen der Biomembranen beruht. Durch die gleichmäßige Verteilung im Körperwasser dringt

Äthanol in alle Zellmembranen ein, wo sein Aufenthalt zwischen den Fettsäureresten der Membranphospholipide ein erhöhtes "Fließverhalten" (engl.: fluidity) und ein Ausdehnen der Membran auslöst. Diesem primär physikalischen Effekt folgt eine Kaskade von weiteren Ereignissen wie die Änderung der Transportverhältnisse durch die Membran und die Aktivierung membranassoziierter Enzyme. Unter anderem wird hierbei die membranständige Adenylatcyclase stimuliert und in der sich ergebenden Konsequenz, einem erhöhten intrazellulären Gehalt an zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP), wird von manchen Autoren die eigentliche Ursache der Äthanolbedingten Suppression mancher Körperabwehrvorgänge gesehen (LENAZ et al., 1976; ATKINSON et al., 1977; LENAZ et al., 1978; CHIN et al., 1979; FREUND, 1979).

Denkbar wäre, daß die unter dem Einfluß einer geringen Äthanolkonzentration gefundene erhöhte Phagozytoseaktivität das Ergebnis eines leicht erhöhten "Fließverhaltens" der (hauptsächlich aus der bimolekularen Lipidschicht bestehenden) Zellwand darstellt, ist doch die Umfließung des Partikels durch den Zelleib des Makrophagen ein entscheidender Schritt für den Phagozytosevorgang. Voraussetzung für diesen positiven Effekt wäre eine niedere Alkoholkonzentration, bei der die Integrität der Zellwand absolut gewährleistet bleibt.

Die bei den mit INFLUEX in alkoholischer Lösung behandelten dysgammaglobulinämischen Hühnern gefundene hohe Konzentration an Anti-HSA IgG-Antikörpern ist vermutlich die Folge der Alkoholwirkung, da die alkoholbehandelten Tiere dieselben Verhältnisse zeigten, während die mit INFLUEX in wässriger Lösung Tiere ebenso wie die Tiere der Kontrollgruppe nur sehr geringe Mengen an antigenspezifischen IgG-Antikörpern produzierten.

Sowohl die mit INFLUEX in alkoholischer Lösung als auch die mit INFLUEX in wässriger Lösung behandelten Tiere zeigten gegenüber der Kontrollgruppe besonders in den ersten Tagen nach der Immunisierung stark erhöhte Serum-IgG-Konzentrationen (Abb. 9). Dies und die tendentiell erhöhten Serum-IgM-Spiegel der mit INFLUEX in alkoholischer Lösung behandelten Tiere (Abb. 10) läßt an einen möglichen mitogenen Charakter von INFLUEX denken, was mit der Meinung von FRÖHLICH und BICHL (1985) übereinstimmt, die den resistenzfördernden Phytopharmaka eine Mitogenwirkung zuschrieben. Mitogene besitzen eine den Zellstoffwechsel von Lymphozyten aktivierende, die Lymphozyten zu Blastzellen transformierende Wirkung, wobei mehrere Lymphozytenklone ohne Bevorzugung eines spezifischen Rezeptors stimuliert werden, ohne eine Gedächtnisreaktion zu hinterlassen. STIMPEL und PROKSCH (1983) beschrieben einen bei in vitro Versuchen festgestellten, allerdings sehr moderaten mitogenen Effekt der Echinacea-Polysaccharide sowohl auf T- als auch auf B-Lymphozyten, der überdies erst bei einer mehrfachen der zur Phagozytosestimulierung notwendigen Dosis zutage trat. Es ist deshalb und aufgrund der bereits diskutierten Resorptionsmöglichkeiten der Echinacea-Polysaccharide nicht unwahrscheinlich, daß der im Rahmen dieser Untersuchungen festgestellte, INFLUEX-bedingte Mitogeneffekt einem anderen Inhaltstoff als den Polysacchariden zuzuordnen ist. Bemerkenswert ist auch bei diesem Ergebnis, daß das für die IgG-Bildung verantwortliche Lymphozytensystem viel sensibler auf einen äußeren Stimulus reagiert als das IgM-System.

Bezüglich der Phagozytoseaktivität zeigten die mit INFLUEX behandelten Tiergruppen kein eindeutiges Verhalten: Während die sowohl mit INFLUEX in alkoholischer Lösung als auch die mit INFLUEX in wässriger Lösung behandelten Kon-

trollhühner ähnliche Phagozytosesteigerungen wie die alkoholbehandelten Tiere zeigten, lag der durchschnittliche Phagozytoseindex der mit INFLUEX in wässriger Lösung behandelten dysgammaglobulinämischen Hühner etwas unter dem Niveau der Kontrollgruppe. Da zwischen Kontrollhühnern und dysgammaglobulinämischen Hühnern aus bereits diskutierten Gründen keine Kompetenzunterschiede bezüglich der nicht immunologischen Phagozytose vorhanden sein dürften, ist eine Interpretation der unterschiedlichen Ergebnisse der beiden mit INFLUEX in wässriger Lösung behandelten Gruppen trotz der Zugehörigkeit zu verschiedenen Hühnerlinien nicht einfach. Setzt man voraus, daß die bei der mit INFLUEX in alkoholischer Lösung gefundenen Phagozytosesteigerung bei den Kontrollhühnern kein Alkoholeffekt war, sondern daß INFLUEX auch bei oraler Verabfolgung trotz des Kupierens der Polysaccharide bei der Resorption noch eine restliche phagozytosestimulierende Wirkung besitzt, so müßte man bei der Interpretation der unter den Werten der wasserbehandelten Kontrollgruppe liegenden Phagozytoseindices der mit INFLUEX in wässriger Lösung behandelten dysgammaglobulinämischen Hühner an eine trotz Randomisierung unglücklich erfolgte Gruppeneinteilung in Gegenwart doch beachtlicher Streuungen denken.

Die Phagozytose nimmt innerhalb der spezifischen und der unspezifischen Körperabwehr eine herausragende Position ein, so daß eine Stimulierung der anderen Elemente der Abwehr ohne die Existenz aktivierter Makrophagen, dem "Schlüssel zur Resistenzsteigerung", nicht unschwer vorzustellen ist (HÄNSEL, 1981). VAINIO und RATCLIFFE (1983) fanden bei in vitro Untersuchungen mit peripheren Blutleukozyten vom Huhn, daß zur Mitogen-vermittelten Lymphozytenproliferation die Gegenwart von Makrophagen essentiell ist. Soweit diese in vitro-Ergebnisse mit dem in vivo-Verhalten in Einklang zu bringen ist, hieße dies,

daß nur in Gegenwart aktivierter Makrophagen, sprich erhöhter Phagozytosepotenz mit einer Stimulierung der zur Immunglobulinsynthese befähigten Zellsysteme zu rechnen ist. (Abb. 23)

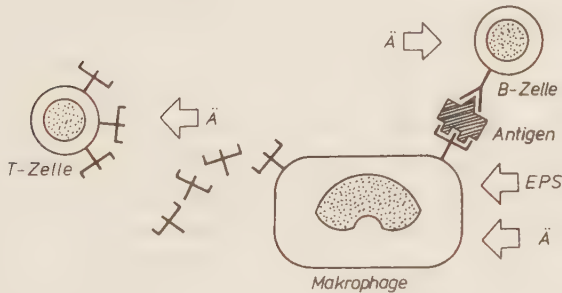


Abb. 23 Mögliche Interaktionen zwischen Makrophagen und Lymphozyten. Freigesetzte T-Zell-Antigenrezeptoren binden sich an den Makrophagen; diese Antigenpräsentation am Makrophagen ermöglicht den B-Lymphozyten die Antikörperbildung.

Ä : rein physikalischer Angriffspunkt des Alkohols an allen Zellen

EPS : hauptsächlicher Angriffspunkt der Echinacea-Polysaccharide am Makrophagen

(modifiziert nach BIER et al., 1979)

Faßt man unter Berücksichtigung dieser Aspekte die Ergebnisse dieser Untersuchungen noch einmal zusammen, läßt sich sagen, daß einmalig verabreichte, niedrige Alkoholmengen offenbar über eine Stimulierung von Makrophagen zu einer Erhöhung der bei den jeweiligen Hühnerlinien sonst

im Verlauf der Immunantwort am wenigsten stark repräsentierten Antikörperklassen führen, während für die diskutierte mitogene Wirkung von INFLUEX ein Makrophagen-vermittelter Mechanismus nicht eindeutig herausgestellt werden kann.

4.ZUSAMMENFASSUNG

Der Einfluß einer kleinen Menge Äthylalkohol (0.1 ml / kg Körpermasse) bzw. von INFLUEX sowohl in alkoholischer (handelsüblicher) als auch in entalkoholisierter Lösung (ebenfalls 0.1 ml / kg Körpermasse) auf das Abwehrsystem verschiedener Hühnerlinien wurde untersucht.

Dabei wurden die Serumimmunglobulinkonzentrationen mit der Rocket-Immunelektrophorese und die gegen das 30 min nach Alkohol- bzw. INFLUEXapplikation parenteral verabreichte T-Zell-abhängige Immunisierungsantigen Humanserumalbumin gebildeten Antikörper mit dem Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) gemessen. Außerdem wurde mit dem Carbon-Clearance-Test die Phagozytoseaktivität der hepatosplenischen Makrophagen 24 Stunden nach der Verabfolgung von Alkohol und INFLUEX bestimmt.

Der Alkoholeffekt bestand bei Kontrolltieren und keimfrei gehaltenen Tieren aus einer erhöhten Bildung von immunisierungsantigenspezifischen Antikörpern der Klasse IgA bzw. bei den immundefizienten dysgammaglobulinämischen UM-B19 Hühnern aus einer vermehrten IgG-Antikörperproduktion, wobei letztere Hühner jedoch weniger IgM-Antikörper produzierten als eine wasserbehandelte Kontrollgruppe. Bei Kontrollhühnern, dygammaglobulinämischen Hühnern und bei agammaglobulinämischen (hormonell burssektomierten)

Hühnern konnte durch Äthanol eine geringe Steigerung der Phagozytoseaktivität gezeigt werden.

Der Wirkung von INFLUEX auf die Immunglobulinkonzentration und Antikörperbildung wurde nur bei den UM-B19 Hühnern untersucht. Hier konnte eine durch den Einfluß von INFLUEX sowohl in alkoholischer als auch in entalkoholisierter Lösung bedingte gesteigerte Bildung von Immunglobulin G beobachtet werden.

Der Einfluß von INFLUEX auf die Phagozytoseleistung war nicht eindeutig zu beurteilen: Bei den Kontrollhühnern konnte eine Phagozytosestimulierung festgestellt werden, während die dysgammaglobulinämischen Tiere mit einer minimalen Phagozytosesuppression reagierten.

Die erhaltenen Ergebnisse wurden in Zusammenhang mit den verwendeten Methoden diskutiert.

5. SUMMARY

Effects of InflueX^R and ethanol on the defense system of different chicken lines

The influence of a small quantity of ethanol, of INFLUEX in alcohol (regular pharmaceutical preparation) as well as INFLUEX in alcohol-free solution (all 0.1 ml/ kg body weight) on the immun system of various lines of chickens was investigated.

Alcohol or one of the INFLUEX solutions were given by oral application, followed 30 min later by parenteral application of T-cell dependent immunizing antigen HSA. The serum immunoglobulin concentration was measured by means of rocket immunoelectrophoresis. The HSA induced antibodies were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The phagocytic activity of liver and spleen macrophages were determined by the carbon clearance test 24 hours after the alcohol or INFLUEX application.

Ethanol produced an increase in antigen specific IgA antibodies in control and germfree animals. In immunodeficient dysgammaglobulinemic UM- B19 chickens it produced an IgG increase, although these produced less IgM antibodies than a water-treated control group. Control, dysgammaglobulinemic and agammaglobulinemic (hormonally bursectomized) chickens all showed a small increase in phagocytic activity with ethanol.

Only UM-B19 chickens were used to investigate the effect of INFLUEX on immunoglobulin concentration and antibody production. INFLUEX, both in alcoholic and non-alcoholic solution, caused an increased production in IgG.

The influence of INFLUEX on the phagocytosis was not so clear; phagocytosis in control animals was stimulated whereas in dysgammaglobulinemic animals it was mildly depressed.

The results are discussed in connection with the methods used.

7. TABELLARISCHER ANHANG

Tabelle 1

Serumimmunglobulinkonzentrationen und Anti-HSA Antikörperkonzentrationen von Kontrollhühnern nach Injektion von HSA und oraler Verabreichung von Wasser

ELISAEINHEITEN						mg/ml					
Nr.	Tag	a-HSA	IgG	a-HSA	IgM	a-HSA	IgA	IgG	IgM	IgA	
258	0		0.0		22,8		0,0		3.39	1.52	0.054
	8		376.4		122.5		2.1		4.42	2.92	0.067
	14		528.7		42.7		0,0		4.02	2.25	0.081
	21		236,6		19.1		0,0		4.11	1.59	0.114
260	0		0,0		9.8		0,0		3.36	0.41	0.113
	8		3508.1		123.3		0,0		4.28	1.00	0.102
	14		927.0		28.3		0,0		4.36	1.15	0.109
	21		384.4		6.0		0,0		5.37	1.30	0.102
261	0		0,0		4.2		0,0		3.93	0.63	0.078
	8		1919.4		115.1		0.6		5.03	1.73	0.093
	14		841.3		20.6		0,0		3.75	1.52	0.100
	21		155.0		8.5		0,0		4.05	1.48	0.097
263	0		0,0		7.4		0.0		3.87	1.09	0.100
	8		3388.6		301.6		8.2		5.21	1.69	0.119
	14		823.9		108.8		0,0		3.69	1.01	0.106
	21		314.4		17.2		0,0		3.69	1.01	0.119
292	0		0,0		8.6		0,0		9.31	4.12	0.185
	8		1815.9		518.0		4.0		9.56	4.21	0.155
	14		1214.8		193.5		0,0		6.96	3.02	0.122
	21		348.8		35.9		0,0		6.59	3.52	0.100
293	0		0,0		5.2		0,0		3.72	2.32	0.186
	8		1987.1		457.2		8.6		5.34	3.00	0.134
	14		2412.8		199.0		1.4		4.37	2.14	0.103
	21		466.7		21.6		0,0		7.95	2.47	0.140
294	0		0,0		4.8		0,0		6.63	2.97	0.144
	8		1266.3		595.0		5.2		7.74	3.40	0.127
	14		1508.8		295.4		2.0		8.37	1.76	0.121
	21		907.9		57.1		0,0		6.00	2.13	0.115
x̄	0		0,0		8.9		0,0		4.88	1.86	0.122
	8		2037.4		318.9		4.1		5.94	2.56	0.113
	14		1179.6		126.9		0.5		5.07	1.83	0.106
	21		401.9		23.6		0,0		5.39	1.93	0.112
s	0		0,0		6.4		0,0		2.08	1.24	0.047
	8		2579.6		208.4		3.4		1.81	1.04	0.026
	14		931.5		105.3		0.8		1.69	0.64	0.013
	21		252.2		17.7		0.0		1.44	0.79	0.014

Tabelle 2

Serumimmunglobulinkonzentrationen und Anti-HSA Antikörperkonzentrationen von Kontrollhühnern nach Injektion von HSA und oraler Verabreichung von Alkohol

ELISAEINHEITEN							mg/ml			
Nr.	Tag	a-HSA	IgG	a-HSA	IgM	a-HSA	IgA	IgG	IgM	IgA
278	0	0,0		12.8		0.2		9.91	3.35	0.116
	8	1537.6		853.2		30.6		14.63	4.81	0.180
	14	1275.2		444.7		10.4		13.41	2.83	0.121
	21	1329.3		67.0		0,0		8.74	2.81	0.130
279	0	0.0		12.5		0,0		2.82	2.80	0.098
	8	1214.8		398.0		4.0		4.32	3.51	0.095
	14	655.5		184.4		2.0		3.63	5.01	0.095
	21	368.7		63.8		0.7		3.61	4.40	0.120
280	0	0.0		10.9		0.1		2.10	0.51	0.082
	8	1301.9		412.0		9.3		6.52	1.00	0.088
	14	646.5		83.1		2.1		2.91	0.50	0.079
	21	230.1		18.4		0.7		2.53	0.70	0.084
281	0	0,0		7.2		0,0		8.22	2.39	0.079
	8	1614.3		149.8		3.7		10.32	3.17	0.084
	14	633.3		44.2		0.0		9.93	2.61	0.072
	21	295.4		21.5		0.0		8.31	2.16	0.087
282	0	0,0		14.9		0,0		4.24	3.25	0.102
	8	4893.8		104.4		4.7		8.02	4.35	0.087
	14	447.8		54.0		0.4		6.88	3.86	0.093
	21	712.5		24.5		0.0		7.26	4.47	0.102
283	0	0,0		14.6		0,0		12.34	5.27	0.193
	8	1284.2		536.2		10.7		6.83	4.01	0.118
	14	387.1		147.7		2.5		3.92	2.47	0.124
	21	115.9		34.7		0.0		3.69	2.05	0.109
284	0	26.8		4.0		0.0		6.07	1.41	0.062
	8	2144.6		381.8		5.7		7.68	2.38	0.086
	14	889.2		89.0		1.8		5.27	1.41	0.062
	21	236.6		70.3		0.0		5.80	1.41	0.063
295	0	0.0		8.6		0.0		5.27	1.74	0.106
	8	1079.7		91.5		4.4		5.12	2.32	0.103
	14	517.8		25.9		1.7		3.66	1.87	0.103
	21	122.4		21.8		0.7		3.66	2.00	0.108
x̄	0	3.3		10.7		0.0		6.36	2.58	0.104
	8	1883.9		365.9		9.1		7.92	3.19	0.105
	14	681.5		134.1		2.6		6.19	2.56	0.093
	21	426.4		44.2		0.3		5.44	2.49	0.100
s	0	9.5		3.8		0.1		3.31	1.35	0.030
	8	3269.5		266.0		9.0		3.04	1.16	0.030
	14	300.9		136.4		3.3		3.46	1.31	0.020
	21	484.8		22.7		0.4		2.24	1.25	0.020

Tabelle 3

Serumimmunglobulinkonzentrationen und Anti-HSA Antikörperkonzentrationen von dysgammaglobulinämischen Hühnern nach Injektion von HSA und oraler Verabreichung von Wasser

		ELISAEINHEITEN				mg/ml		
Nr.	Tag	a-HSA IgG	a-HSA IgM	a-HSA IgA	IgG	IgM	IgA	
3204	0	0,0	4.3	0.0	0.027	3.93	0.071	
	8	5.5	1570.2	25.8	0.047	3.81	0.067	
	14	9.0	371.5	7.3	0.038	1.96	0.058	
	21	5.8	83.6	2.2	0.053	5.14	0.091	
3205	0	0,0	4.0	0.3	0.002	3.43	0.489	
	8	0,0	1718.3	103.4	0.011	4.71	0.572	
	14	0.1	1072.9	13.2	0.006	4.32	0.406	
	21	1.7	152.9	4.4	0.002	4.07	0.276	
3207	0	0.0	14.6	0.5	0.002	4.07	0.279	
	8	0.5	257.2	9.6	0.007	4.92	0.381	
	14	0.2	121.7	2.5	0.006	6.96	0.454	
	21	0,0	18.7	0.5	0.007	6.21	0.454	
3209	0	0.0	3.6	0.0	0.016	3.05	0.006	
	8	1.7	966.6	9.5	0.031	3.70	0.004	
	14	4.9	225.5	4.1	0.041	3.00	0.003	
	21	7.2	111.9	1.1	0.088	3.27	0.006	
3210	0	0.0	2.0	0.0	0.000	0.60	0.253	
	8	2.1	33.9	1.5	0.019	0.58	0.285	
	14	2.1	85.4	2.3	0.016	0.64	0.364	
	21	1.1	9.8	0.3	0.002	0.33	0.028	
3212	0	0.0	5.9	0.0	0.017	2.35	0.001	
	8	2.2	722.4	13.8	0.048	3.57	0.021	
	14	2.4	105.9	2.1	0.071	5.17	0.023	
	21	1.4	31.7	0.4	0.028	3.42	0.026	
3214	0	0.0	1.8	0.0	0.030	2.87	0.253	
	8	2.2	259.0	12.5	0.049	3.37	0.327	
	14	1.3	210.4	4.5	0.041	4.13	0.349	
	21	0.6	25.0	0.9	0.029	2.80	0.253	
$\bar{x}$	0	0.0	5.2	0.1	0.013	2.90	0.193	
	8	2.0	789.7	25.2	0.030	3.52	0.236	
	14	2.9	313.3	5.1	0.032	3.73	0.236	
	21	2.5	61.9	1.4	0.030	3.60	0.184	
s	0	0.0	4.4	0.2	0.013	1.17	0.177	
	8	1.8	1024.9	35.3	0.018	1.42	0.213	
	14	3.2	388.0	3.9	0.023	2.09	0.200	
	21	2.8	54.9	1.5	0.031	1.86	0.161	

Tabelle 4

Serumimmunglobulinkonzentrationen und Anti-HSA Antikörperkonzentrationen von dysgammaglobulinämischen Hühnern nach Injektion von HSA und oraler Verabreichung von Alkohol

ELISAEINHEITEN							mg/ml			
Nr.	Tag	a-HSA	IgG	a-HSA	IgM	a-HSA	IgA	IgG	IgM	IgA
3122	0	0.0		8.6		0.1		0.020	1.77	0.316
	8	43.3		423.0		7.3		0.183	2.50	0.299
	14	29.9		72.3		1.6		0.172	3.52	0.410
	21	17.8		33.5		0.5		0.150	2.43	0.361
3125	0	0.0		0.0		0.1		0.030	4.72	0.335
	8	0.8		790.6		15.3		0.057	5.60	0.311
	14	1.8		790.6		17.1		0.043	4.72	0.225
	21	7.0		271.8		4.5		0.037	3.02	0.230
3132	0	0.0		16.7		0.7		0.016	5.27	0.553
	8	17.7		379.2		11.1		0.063	5.04	0.448
	14	8.4		105.9		2.6		0.071	7.29	0.764
	21	8.4		38.5		1.2		0.050	5.27	0.548
3137	0	0.8		22.2		0.2		0.783	4.38	0.186
	8	39.0		403.6		9.9		1.259	6.73	0.254
	14	26.2		144.6		3.8		0.750	5.11	0.195
	21	34.4		145.6		3.2		0.923	7.61	0.292
3138	0	0.0		3.5		0.0		0.034	1.85	0.367
	8	3.8		570.7		8.0		0.044	2.29	0.349
	14	2.8		181.8		4.9		0.041	3.36	0.421
	21	7.7		188.2		5.9		0.051	2.87	0.389
3145	0	0.0		7.8		0.5		0.116	5.39	0.588
	8	341.7		157.2		15.6		0.289	3.96	0.442
	14	257.1		71.8		2.5		0.288	4.91	0.557
	21	167.3		34.2		1.3		0.226	4.35	0.548
$\bar{x}$	0	0.1		9.8		0.3		0.166	3.89	0.390
	8	74.4		454.0		11.2		0.316	4.35	0.350
	14	54.4		227.8		5.4		0.227	4.81	0.428
	21	40.4		18.6		2.8		0.239	4.25	0.394
s	0	0.3		8.3		0.3		0.304	1.65	0.152
	8	132.2		215.1		3.6		0.471	1.76	0.079
	14	100.0		293.6		5.8		0.273	1.41	0.212
	21	63.0		99.8		2.1		0.342	1.95	0.131

Tabelle 5

Serumimmunglobulinkonzentrationen und Anti-HSA Antikörperkonzentrationen von dysgammaglobulinämischen Hühnern nach Injektion von HSA und oraler Verabreichung von INFLUEX in alkoholischer Lösung

ELISAEINHEITEN							mg/ml		
Nr.	Tag	a-HSA IgG	a-HSA IgM	a-HSA IgA	IgG	IgM	IgA		
3146	0	0.0	0.0	0.0	0.000	4.79	0.383		
	8	0.8	3054.7	138.4	0.023	7.32	0.632		
	14	0.6	1636.9	30.5	0.021	8.19	0.485		
	21	0.9	134.9	3.1	0.014	5.80	0.395		
3148	0	0.0	2.5	0.0	0.011	1.13	0.313		
	8	0.2	496.9	16.2	0.032	2.90	0.301		
	14	0.4	41.8	2.0	0.016	0.99	0.235		
	21	1.0	16.5	0.6	0.024	2.40	0.330		
3149	0	0.0	5.0	0.0	0.038	3.07	0.290		
	8	6.5	438.6	13.3	0.131	3.92	0.370		
	14	6.1	283.4	5.4	0.131	4.20	0.400		
	21	6.9	56.7	1.5	0.108	4.67	0.391		
3151	0	0.0	3.0	0.3	0.000	0.98	0.345		
	8	2.7	339.3	27.9	0.030	1.80	0.380		
	14	1.5	73.3	3.2	0.017	0.98	0.305		
	21	1.2	11.4	0.7	0.015	1.06	0.415		
3156	0	0.0	5.6	0.2	0.027	3.90	0.422		
	8	166.1	251.9	8.8	0.124	3.64	0.348		
	14	248.4	68.9	1.8	0.104	6.26	0.388		
	21	91.5	41.5	0.8	0.094	6.30	0.386		
3157	0	0.0	13.6	0.2	0.006	6.68	0.023		
	8	0.6	633.3	15.5	0.019	7.45	0.053		
	14	0.6	248.4	9.0	0.009	7.70	0.027		
	21	0.9	120.8	2.2	0.006	8.50	0.025		
$\bar{x}$	0	0.0	4.9	0.1	0.013	3.42	0.296		
	8	29.5	869.1	36.7	0.059	4.50	0.347		
	14	42.9	392.2	8.6	0.049	4.71	0.306		
	21	17.1	63.6	1.5	0.043	4.79	0.323		
s	0	0.0	4.7	0.1	0.016	2.19	0.141		
	8	66.9	2440.8	50.2	0.052	2.24	0.185		
	14	100.7	909.7	11.0	0.053	3.20	0.161		
	21	36.5	52.6	1.0	0.041	2.70	0.149		

Tabelle 6

Serumimmunglobulinkonzentrationen und Anti-HSA Antikörperkonzentrationen von dysgammaglobulinämischen Hühnern nach Injektion von HSA und oraler Verabreichung von INFLUEX in wässriger Lösung

ELISAEINHEITEN						mg/ml				
Nr.	Tag	a-HSA	IgG	a-HSA	IgM	a-HSA	IgA	IgG	IgM	IgA
3190	0	0.0		13.0		0.0		0.005	3.21	0.057
	8	0.0		34.2		0.6		0.007	2.95	0.051
	14	0.0		429.5		8.9		0.011	2.95	0.087
	21	0.0		44.5		0.7		0.004	2.43	0.075
3191	0	0.0		0.0		0.0		0.000	0.187	0.093
	8	0.0		4.0		0.3		0.000	0.155	0.034
	14	0.0		2.3		0.0		0.000	0.155	0.054
	21	0.0		0.0		0.0		0.000	0.096	0.074
3193	0	0.0		12.3		0.0		0.025	6.85	0.022
	8	0.0		1694.7		11.1		0.029	9.68	0.093
	14	0.0		233.4		2.1		0.021	8.27	0.022
	21	0.3		71.8		1.5		0.019	8.03	0.022
3194	0	0.0		3.6		0.0		0.000	2.07	0.002
	8	0.0		17.1		3.9		0.000	1.86	0.008
	14	0.0		91.5		1.9		0.000	1.86	0.002
	21	0.0		24.3		0.4		0.000	1.54	0.008
3195	0	0.0		4.0		0.0		0.003	2.42	0.014
	8	22.1		1036.0		26.2		0.098	3.22	0.042
	14	11.8		77.5		1.9		0.069	4.59	0.026
	21	9.8		54.8		1.4		0.045	4.59	0.025
3196	0	0.0		3.5		0.0		0.006	3.29	0.205
	8	0.0		1636.9		19.3		0.019	3.50	0.229
	14	0.0		417.8		7.5		0.010	3.09	0.223
	21	0.4		68.9		1.6		0.010	2.46	0.199
$\bar{x}$	0	0.0		6.1		0.0		0.006	3.00	0.065
	8	3.7		737.3		10.2		0.025	3.56	0.076
	14	1.9		208.7		3.7		0.018	3.48	0.069
	21	1.7		44.0		0.9		0.013	3.19	0.067
s	0	0.0		5.3		0.0		0.011	2.19	0.075
	8	9.0		1480.7		10.7		0.037	3.23	0.078
	14	4.8		183.9		3.6		0.026	2.76	0.080
	21	3.9		27.7		0.7		0.017	2.78	0.070

Tabelle 7

Serumimmunglobulinkonzentrationen und Anti-HSA Antikörperkonzentrationen von keimfreien Hühnern nach Injektion von HSA und oraler Verabreichung von Wasser

ELISAEINHEITEN						mg/ml				
Nr.	Tag	a-HSA	IgG	a-HSA	IgM	a-HSA	IgA	IgG	IgM	IgA
Gf 4	0	0.0		0.9		0.0		0.047	0.141	0.0036
	5	19.3		7.9		0.3		0.106	0.231	0.0092
	8	138.7		0.0		0.0		0.677	0.113	0.0078
	14	118.3		0.0		0.0		0.374	0.199	0.0050
	21	47.0		0.0		0.0		0.159	0.259	0.0073
Gf 5	0	0.0		1.3		0.0		0.109	0.132	0.0044
	5	25.2		12.1		0.6		0.219	0.187	0.0103
	8	368.8		2.2		0.0		0.521	0.113	0.0090
	14	194.9		1.5		0.0		0.383	0.182	0.0045
	21	62.1		1.2		0.0		0.335	0.246	0.0069
$\bar{x}$	0	0.0		1.1		0.0		0.078	0.136	0.0039
	5	22.3		10.0		0.5		0.162	0.209	0.0097
	8	253.8		1.1		0.0		0.599	0.113	0.0084
	14	156.6		0.8		0.0		0.378	0.190	0.0047
	21	54.5		0.6		0.0		0.247	0.252	0.0070
s	0	0.0		0.3		0.0		0.043	0.009	0.0078
	5	4.2		3.0		0.2		0.079	0.031	0.0078
	8	163.3		1.6		0.0		0.110	0.007	0.0078
	14	54.2		1.1		0.0		0.009	0.013	0.0078
	21	10.7		0.8		0.0		0.124	0.011	0.0078

Tabelle 8

Serumimmunglobulinkonzentrationen und Anti-HSA Antikörperkonzentrationen von keimfreien Hühnern nach Injektion von HSA und oraler Verabreichung von Alkohol

Nr.	Tag	ELISAEINHEITEN				mg/ml			
		a-HSA IgG	a-HSA IgM	a-HSA IgA	IgG	IgM	IgA		
Gf 1	0	0.0	1.0	0.0	0.059	0.088	0.0000		
	5	0.0	0.9	0.0	0.079	0.091	0.0000		
	8	0.3	2.1	0.0	0.069	0.098	0.0000		
	14	0.5	1.1	0.0	0.097	0.144	0.0000		
	21	0.3	1.2	0.0	0.112	0.141	0.0000		
Gf 2	0	0.0	1.3	0.0	0.108	0.075	0.0000		
	5	0.0	2.0	0.0	0.108	0.079	0.0000		
	8	1.9	4.6	0.1	0.134	0.076	0.0000		
	14	4.6	2.6	0.0	0.187	0.093	0.0000		
	21	2.8	1.7	0.0	0.187	0.105	0.0000		
Gf 3	0	0.0	0.0	0.0	0.208	0.109	0.0007		
	5	20.6	18.4	1.4	0.324	0.143	0.0061		
	8	260.7	8.2	1.8	0.938	0.099	0.0068		
	14	260.7	0.0	0.0	0.683	0.131	0.0041		
	21	38.4	0.0	0.0	0.509	0.133	0.0000		
Gf 6	0	0.0	0.0	0.0	0.101	0.148	0.0092		
	5	33.2	44.5	1.8	0.362	0.302	0.0210		
	8	438.5	17.7	2.0	1.218	0.175	0.0242		
	14	243.3	0.0	0.0	0.791	0.229	0.0139		
	21	73.8	0.0	0.0	0.388	0.217	0.0107		
Gf 7	0	0.0	1.7	0.1	0.050	0.142	0.0055		
	5	24.2	31.0	1.4	0.390	0.280	0.0067		
	8	528.8	19.8	1.7	1.182	0.137	0.0068		
	14	168.5	2.4	0.0	0.542	0.210	0.0060		
	21	80.8	2.8	0.0	0.087	0.210	0.0050		
$\bar{x}$	0	0.0	0.8	0.0	0.105	0.112	0.0030		
	5	15.6	19.4	0.9	0.252	0.179	0.0067		
	8	246.0	10.5	1.1	0.708	0.117	0.0081		
	14	135.5	1.2	0.0	0.460	0.161	0.0048		
	21	39.2	1.1	0.0	0.256	0.175	0.0031		
s	0	0.0	0.8	0.05	0.062	0.032	0.0085		
	5	14.9	18.8	0.8	0.147	0.105	0.0107		
	8	250.9	7.9	0.9	0.564	0.038	0.0116		
	14	136.3	1.3	0.0	0.304	0.056	0.0091		
	21	37.9	1.2	0.0	0.184	0.071	0.0087		

Tabelle 9

Phagozytoseindices von Kontrolltieren nach oraler Applikation von

a) Wasser

Nr. Phagozytoseindex

W 1	-0.099
W 2	-0.136
W 3	-0.199
W 4	-0.140
$\bar{X}$	-0.143
s	-0.035

b) Alkohol

Nr. Phagozytoseindex

A 1	-0.164
A 2	-0.228
A 3	-0.213
A 4	-0.132
$\bar{X}$	-0.184
s	-0.038

c) INFLUEX in alkoh. Lösung

Nr. Phagozytoseindex

IA 1	-0.220
IA 2	-0.180
IA 3	-0.197
IA 4	-0.169
IA 5	-0.175
$\bar{X}$	-0.188
s	-0.018

d) INFLUEX in wässr. Lösung

Nr. Phagozytoseindex

IW 1	-0.191
IW 2	-0.158
IW 3	-0.151
IW 4	-0.292
IW 5	-0.144
$\bar{X}$	-0.187
s	-0.054

Tabelle 10

Phagozytoseindices von dysgammaglobulinämischen Tieren
nach oraler Verabreichung von
a) Wasser

Nr.	Phagozytoseindex
3249	-0.232
3253	-0.116
3254	-0.137
3252	-0.166
$\bar{x}$	-0.162
s	-0.050

b) Alkohol

Nr.	Phagozytoseindex
3261	-0.156
3255	-0.199
3257	-0.164
3251	-0.165
$\bar{x}$	-0.171
s	-0.019

c) INFLUEX in wässr. Lösung

Nr.	Phagozytoseindex
3258	-0.108
3256	-0.127
3238	-0.077
3260	-0.287
$\bar{x}$	-0.149
s	-0.093

Tabelle 11

Phagozytoseindices von agammaglobulinämischen Tieren nach
oralen Verabreichung von
a) Wasser

Nr.	Phagozytoseindex
061	-0.144
083	-0.148
$\bar{x}$	-0.146
s	-0.002

b) Alkohol

Nr.	Phagozytoseindex
034	-0.125
064	-0.199
078	-0.187
$\bar{x}$	-0.170
s	-0.039

8. LITERATURVERZEICHNIS

ALI, M.V. and J.P. NOLAN

Alcohol induced depression of reticuloendothelial function of the rat.

J. Lab. Clin. Med. 70, 295 (1967)

ALTMANN, B.

Die Beeinflussung gestörter und unreifer Immunsysteme durch bakterielles Lipopolysaccharid am Beispiel des Haushuhnes.

Diss. vet. med., München (1984)

ATKINSON, J.P., T.J. SULLIVAN, J.P. KELLY and C.W. PARKER

Stimulation by alcohols of cyclic AMP metabolism in human leukocytes

J. Clin. Invest., 60, 284 (1977)

ATWATER, J.S. and T.B. TOMASI jr.

Suppressor cells and IgA deficiency.

Clin. Immunol. Immunopathol., 9, 379 (1978)

AWADHIYA, R.P., J.L. VEGAD and G.N. KOLTE

Demonstration of the phagocytic activity of chicken thrombocytes using colloidal carbon.

Res. Vet. Sci. 29, 120 (1980)

BENEDICT, A.A., H.A. ABPLANALP, L.W. POLLARD and L.Q. TAM

Inherited immunodeficiency in chickens: a model for common variable hypogammaglobulinemia in man.

Adv. Exp. Med. Biol., 88, 197 (1977)

BIER, O.G., D. GÖTZE, I. MOTA und W.D. DA SILVA

Experimentelle und klinische Immunologie.

Springer Verlag Berlin-Heidelberg-New-York (1979)

BIOZZI, G., B. BENACERRAF and B.N. HALPERN

Quantitative study of the granulopoietic activity of the reticulo-endothelial system II: A study of the kinetics of the granulopoietic activity of the R.E.S. in relation to the dose of carbon injected. Relationship between the weight of the organs and their activity.

Brit. J. Exp. Path., 34, 441 (1953)

BRÜGGEMANN, J., M. MERKENSCHLAGER, B. KIRCHNER und U. LÖSCH

Eine erbliche Hypo- und Dysgammaglobulinämie beim Haushuhn.

Naturwiss., 54, 97 (1967)

BRÜGGEMANN, J., B. FRIEDRICH und U. LÖSCH

Vergleichende Bestimmung der Immunglobulin-Spiegel genuin dysgammaglobulinämischer und "hormonell bursektomierter" Hühner.

Z. Tierphysiol. Futtter. 24, 317 (1969)

BÜSING, K.H.

Hyaluronidasehemmung durch Echinacin.

Arzneimittel-Forsch., 2, 467 (1952)

BÜSING, K.H.

Die Beeinflussung des Properdin-Spiegels durch Extrakte aus Echinacea bei Kaninchen

Z. Immun. - Forsch., 115, 169 (1958)

CAIAZZA, S.S. and Z. OVARY

Effects of ethanol intake on the immune system of guinea pigs.

Journal of studies on alcohol, 37, 959 (1976)

CAULFIELD, M.J. and SHAFFER, D.

A computer program for the evaluation of ELISA data obtained using an automated microtiter plate absorbance reader.

J. Immunol. Methods, 74, 205 (1984)

CHAN, T.C., A.A. BENEDICT, L.Q. TAM, H.A. APLANALP, and M.E. GERSHWIN

Inherited 7S-immunglobulin deficiency in chickens: presence of supressor T-cells that supress synthesis of 7S immunglobulin but not IgM.

J. Immunol., 125, 108 (1980)

CHANG, C.-F. and P.B. HAMILTON

The thrombocyte as the primary circulating phagocyte in chicken.

J. Reticuloendothel. Soc., 25, 585 (1979)

CHIN, J.H., D.B. GOLDSTEIN and L.M. PARSONS

Fluidity and lipid composition of mouse biomembranes during adaption to ethanol.

Alcoholism: Clin. Exptl. Res., 3, 47 (1979)

DE LA CONCHA, E.Q., J.L.SUBIZA, G. FONTAN, D. PASCUAL-SALCEDO, J. SEQUI and A. BOOTELLO

Disorders of regulatory T-cells in patients with selective IgA deficiency and its relationship to associated autoimmune phenomena.

Clin. Exp. Immun., 49, 410 (1982)

DEUTSCHE HOMÖOPATHISCHE UNION (Hrsg.)

Lebendige Homöopathie

Deutsche Homöopathische Union, 7500 Karlsruhe 41

ENGWALL, E and P. PERLMANN

Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA. III. Quantitation of specific antibodies in antigen coated tubes.

J. Immunol., 109, 129 (1972)

ERICKSON, K.L., M.E.GERSHWIN, H.A. ABPLANALP, R. IKEDA and A.A. BENEDICT

Inherited 7S immunoglobulin deficiency of chickens is associated with bursal degeneration anomalies.

Dev. Comp. Immunol., 6, 105 (1982)

FIEDLER, H., U. LÖSCH and K. HALA

Establishment of a B-compatible chicken line with normogammaglobulinemia and dysgammaglobulinemia.

Fol. Biol. (Praha), 26, 17 (1980)

FIEDLER, H., M. SCHEU, I. KÜHLMANN-RABENS and U. LÖSCH

Kinetics of delayed-type-hypersensitivity (DTH) reactions and Ig levels in FCA-injected dysgammaglobulinemic B 12 chickens.

Immunobiol., 158, 293 (1981)

FITZSIMMONS, R.C., E.M.F. GARROD and I. GARNETT

Immunological responses following early embryonic surgical bursectomy.

Cell. Immunol., 9, 377 (1973)

FORTH, W., D. HENSCHLER und W. RUMMEL (Hrsg.)

Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie.

Bibliographisches Institut, Mannheim-Wien-Zürich (1980)

FREUND, G.

Possible relationships of alcohol in membranes to cancer.

Cancer Res., 39, 2899 (1979)

FRÖHLICH, A, und A. BICHL

Unspezifische Wirkungen auf das Abwehrsystem.

Zeitschrift für Naturheilkunde, 37, 172 (1985)

FÜRSTENBERG, H.S.

Blasenkarzinom und Zytostatika - unspezifischer Reiz und körpereigene Abwehrkräfte.

Praxis, 53, 1744 (1964)

GERHARDT, P.

Über den Einfluß einer unspezifischen Reiztherapie mit Esberitox auf die Leukopoese bei Anwendung ionisierender Strahlen.

Strahlentherapie, 143, 549 (1972)

GIEDON, A. und J.J. SCHEIDEGGER

Kongenitale Immunoparese bei Fehlen spezifischer β_2 -Globuline und quantitativ normalen -Globulinen.

Helv. paediat. Acta, 12, 241 (1957)

GLICK, B., K. SATO and F. COHENOUR

Comparison of the phagocytic ability of normal and burs-ectomized birds.

RES-Journal of the Reticuloendothelial Society, 1, 442, 1964.

GRAEVENITZ, A. von und K.H. HUSMANN

Die Beeinflussung der Serumproperdin-Aktivität durch unspezifische Reiztherapie.

Arzneimittel-Forschung, 10, 184 (1960)

GUARNERI, J.J. and G.A. LAURENZI

Effect of alcohol on the mobilization of alveolar macrophages.

J. Lab. Clin. Med., 72, 40 (1968)

HÄNSEL, R.

Anti-infektiöse Prophylaxe durch Immunstimulantien - unter besonderer Berücksichtigung der Phytopharmaka.

Zeitschrift für angewandte Phytotherapie, V, 172 (1981)

HALLENGREN, B. and A. FORSGEN

Effect of alcohol on chemotaxis, adherence and phagocytosis of human polymorphonuclear leucocytes.

Acta Med. Scand., 204, 43 (1978)

HARNISCHFEGER, G. und H. STOLZE

Bewährte Wirksubstanzen aus Naturstoffen - Sonnenhut.

Verlag Pharmedolinguia, Melsungen. Sonderdruck 10, 484 (1984).

HERLYN, D., H.J. BOHNER and U. LÖSCH

IgG turnover in dysgammaglobulinemic chickens.

Hoppe - Seylers Z. Physiol. Chem., 358, 1169 (1977)

HONG, R. and A.J. AMMAN

Selective absence of IgA.

Ann. J. Pathol., 69, 491 (1972)

KENDALL, R.A. and S. TARGAN

The dual effect of prostaglandin (PGE₂) and ethanol on the natural killer cytolytic process: Effector activation and NK-cell-target cell conjugate lytic inhibition.

J. Immunol., 125, 2770 (1980)

KING, M.A., J.V. WELLS and O.S. NELSON

IgA synthesis by peripheral blood mononuclear cells from normal and selectively IgA deficient subjects.

Clin. Exp. Immunol., 38, 306 (1979)

KINCADE, P.W., K.S. SELF and M.D. COOPER

Survival and function of bursa-derived cells in bursectomized chickens.

Cell. Immunol. 8, 93 (1973)

KÜHLMANN-RABENS, I., R. WANKE, F. STORANDT, B. ALTMANN, U. LÖSCH und M.MERKENSCHLAGER

Attempts on defect localisation in UM-B 19 chickens by means of immunomodulating operations.

Vet. Immunol. Immunopathol. (1985, in Vorbereitung)

LAURELL, C.B.

Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in agarose gel containing antibodies.

Ann. Biochem. 15, 45 (1966)

LAWTON, A.R., P.W. KINCADE and M.D. COOPER

Sequential expression of germ line genes in development of immunoglobulin class diversity.

Fed. Proc., 34, 33 (1975)

LENAZ, G., E.BERTOLI, G. CURATOLA, L.MAZZANTI and A. BIGI

Lipid protein interactions in mitochondria.

Arch. Biochem., 172, 278 (1976)

LENAZ, G., G.CURATOLA, L. MAZZANTI and G.PARENTI-CASTELLI

Biophysical studies on agents affecting the state of membran lipids: Biochemical and pharmacological implications.

Mol. Cell. Biochem., 22, 3 (1978)

LERNER, K.G., B. GLICK and F.C. McDUFFIE

Role of the bursa of Fabricius in IgG and IgM production in the chicken: Evidence for the role of a non-bursal site in the development of humoral immunity.

J. Immunol., 107, 493 (1971)

LIU, Y.K.

Effects of alcohol on granulocytes and lymphocytes.

Seminars in Hematology, 17, 130 (1980)

LÖSCH, U., W. HARTMANN und G. RIEDEL

Zur Antikörperproduktion dysgammaglobulinämischer Hühner II. Präzipitierende Antikörper (Anti-HSA).

Z. Immun. - Forsch., 143, 16 (1972)

LÖSCH, U., I. KÜHLMANN-RABENS, W. KLUMPNER and H. FIEDLER

Course of serum-Ig concentrations in B 12 chickens of the UM line

Immunbiol., 158, 416 (1981)

LOWE, C.R. and P.D.G. DEAN

The principles of affinity chromatography.

Aus: Affinity chromatography , Wiley and Sons, London, 12 - 89.

LUNDY, J., J.H. RAAF, S. DEAKINS, H.J. WANEBO, V.A. JACOBS, T. LEE, D. JACOBOWITZ, C. SPEAR and H.F. OETTGEN

The acute and chronic effects of alcohol on the human immune system.

Surg. Gynec. Obstet., 141, 212 (1975)

MAYER, P.

Die Rolle von Makrophagen in der Abwehr von Infektionskrankheiten.

Wien. tierärztl. Mschr., 71, 345 (1984)

MAYR, A. und M. BÜTTNER

Neue Erkenntnisse über die Grundlage der Paramunität und Paramunisierung.

Berl. Münch. Tierärztl. Wschr., 97, 429 (1984)

MERKENSCHLAGER, M., U. LÖSCH, B. KIRCHNER, G. RIEDEL und F. GRUBER

Immunglobulingehalte im Serum junger gnotobiotischer Mastkücken.

Z. Tierphysiol. Futter., 22, 337 (1967)

MORYIA, O. and Y. ICHIKAWA

J-chain positive cells in bursectomized chicks.

Immunology letters, 7, 289 (1984)

PETERFY, F.P., P. KUUSELA and O. MAKELA

Affinity requirements for antibody assays mapped by monoclonal antibodies.

J. Immunol., 130, 1809 (1983)

PRÜGNER, W.

Untersuchungen zur Con A bzw. PMW induzierten Stimulierbarkeit der Lymphozyten von UM-B 19 Hühnern.

Diss. vet. med., München (1982)

PRUNESCO, P. and C. PRUNESCO

Phagocytosis of bacteria by avian red cells.

Naturwiss., 59, 41 (1972)

RICE, C., D. HUDIG, P. LAD and J. MENDELSON

Ethanol activation of human natural cytotoxicity.

Immunopharmacology, 6, 303 (1983)

RIMLAND, D. and W.L. HAND

The effect of ethanol on adherence and phagocytosis by rabbit alveolar macrophages.

J. Lab. Clin. Med., 95, 918 (1980)

RISTOW, S.S., J.R. STARKEY and G.M. HASS

Inhibition of natural killer cell activity in vitro by alcohols.

Biochem. Biophys. Res. Commun., 105, 1315 (1982)

ROLLE, M. und A. MAYR

Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre.

Ferdinand Enke Verlag Stuttgart (1978)

ROSEN, F.S., J.M. CRAIG G. VAWTER and C.A. JANEWAY

The dysgammaglobulinemias and x-linked tyhmic hypoplasia.

Immunologic deficiency diseases in man. Vol. IV, Nr. 1
February 1968 (1968)

SACHS, L.

Statistische Methoden.

Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New-York (1976)

SCHRANNER, I. and U. LÖSCH

Immunological identification of avian monomeric and polymeric IgM and IgA after fractionation on SDS pore gradient polyacrylamide gels.

Poultry Sci. (in press)

SCHWARTZ, S.A.

Heavy chain-specific supression of immunglobulin synthesis and secretion by lymphocytes from patients with selective IgA deficiency.

J. Immunol., 124, 2034 (1980)

SELL, S.

Immunologie, Immunpathologie und Immunität.

Verlag Chemie, Weinheim-New-York (1977)

STACEY, N.H.

Inhibition of antibody dependent cell-mediated cytotoxicity by ethanol.

Immunopharmacology, 8, 155 (1984)

STERZI, I. und E. WEISS

Herkunft und Phagozytosefähigkeit der Hühnerthrombozyten.

Dtsch. Tierärztl. Wschr., 81, 311 (1974)

STIMPEL, M., A. PROKSCH and M.L. LOHMANN-MATTHES

Polysaccharides from Echinacea purpurea (EPS) - stimulants with high macrophage-specific properties.

Immunbiol., 165, 359 (1983)

STORANDT, F.

Die Beeinflussung des Isotypmusters immundefekter Hühner durch Levamisol.

Diss. vet. med., München (1983)

TISMAN, G. and V. HERBERT

In vitro myelosuppression and immunosuppression by ethanol.

J. Clin. Invest., 52, 1410 (1973)

TYMPNER, K.D.

Der immunbiologische Wirkungsnachweis von Pflanzenextrakten.

Zeitschrift für angewandte Phytotherapie, V, 181 (1981)

UEBEL. I.

Untersuchungen zur Veränderung von Struktur und Aktivität der Immunglobuline des Huhnes nach Inkubation des Serums mit 2-Mercaptoäthanol.

Diss. vet. med., München (1984)

VAINIO, O. and M.J.H. RATCLIFFE

Proliferation of chicken peripheral blood leukocytes in response to Pokeweed mitogen is macrophage-dependent.

Cell. Immunol., 85, 235 (1984)

WACKER, A. und W. HILBIG

Virushemmung mit Echinacea purpurea.

Planta med. (Stuttg.), 33, 89 (1978)

Arzneipflanzen zur Steigerung der körpereigenen Immunabwehr.

Naturheilpraxis, 3/83, 256 (1983)

WALDMANN, T.A., S. BRODER, R. KRAKANER, M. DURN, B. MEADE and C. GOLDMANN.

Defect in IgA specific supressor cells in patients with selective IgA deficiency.

Trans. Ass. Amer. Phycns., 89, 215 (1976)

Herrn Prof. Dr. U. Lösch möchte ich für die Überlassung des Themas sowie für seine allzeit freundliche Unterstützung und hilfreichen Ratschläge beim Anfertigen der vorliegenden Arbeit danken.

Besonders danke ich Frau Dr. I. Schraner für ihre Einarbeitung und vorbildliche Betreuung.

Ferner gilt mein Dank allen Mitarbeitern des Institutes, die mich mit Geistes- und Leibeskräften bei der praktischen Durchführung der Arbeit unterstützten.

Für den zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz danke ich Herrn Prof. Dr. M. Merkschlager und Herrn Prof. Dr. H. Zucker.

LEBENS LAUF

Am 2. November 1959 wurde ich als Sohn des Ernst Klumpp, Schreinermeister und der Lina Klumpp geb. Sieber in Freudenstadt / Schwarzwald geboren. Von April 1966 bis zum Juli 1969 besuchte ich die Volksschule in Dietersweiler, um anschließend auf das Kepler-Gymnasium in Freudenstadt zu wechseln, wo ich am 28. April 1978 mit der Allgemeinen Hochschulreife die Schulausbildung abschloß. Vom Juli 1978 bis zum September 1979 leistete ich in Koblenz meinen Grundwehrdienst. Im November 1979 begann ich an der Ludwig-Maximilians-Universität in München das Studium der Tiermedizin, das ich im Januar 1985 mit dem Staatsexamen abschloß. Am 20. Februar 1985 wurde mir die Approbation als Tierarzt erteilt. Von Januar bis Oktober 1985 erfolgte die Anfertigung der vorliegenden Dissertation. Vom Mai 1985 bis zum Oktober 1985 hatte ich eine Stelle als teilzeitbeschäftigte wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Physiologie, Physiologische Chemie und Ernährungsphysiologie der Tierärztlichen Fakultät der Universität München inne. Seit November 1985 arbeite ich als Assistenz-tierarzt in der Praxis Dr. Schweizer in Feuchtwangen.

